

**APIGENİNİN ANTI-İNFLAMATUAR VE YARA
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
ATOPIK DERMATİT HÜCRE KÜLTÜR MODELİ
KULLANARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**EVALUATION OF APIGENIN'S ANTI-INFLAMMATORY
AND WOUND HEALING EFFECTS USING ATOPIC
DERMATITIS CELL CULTURE MODEL**

Gözdem SAĞLAM

PROF. DR. ESRA BİRBEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2025

Canım anneme,

Benimle gurur duyduğunu biliyorum, seni çok seviyorum.



ÖZET

APIGENİNİN ANTI-İNFLAMATUAR VE YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ATOPIK DERMATİT HÜCRE KÜLTÜR MODELİ KULLANARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

Gözdem SAĞLAM

Yüksek Lisans, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Esra BİRBEN

Nisan 2025, 91 sayfa

Atopik dermatit (AD) günümüzde oldukça sık görülen, özellikle 2 ay ve 5 yaş aralığında ilk semptomların meydana geldiği kronik inflamatuvar bir deri rahatsızlığıdır. Sıklıkla görülen semptomlar arasında cilt kuruluğu, kuru cilde bağlı oluşan kaşıntı, kanayan deri, lezyonlu ve berrak akıntılı yaralar yer almaktadır. Semptomlar genellikle yanak bölgesi, diz arkaları ve ellerde görülmektedir. Aynı zamanda kaşıntı ve pullu derinin yanısıra deride renk değişimine de sıklıkla rastlanmaktadır. Semptomlarda dönem dönem azalma görülse de tekrarlama sıklığı fazladır ve bu semptomlar giderek şiddetlenebilir. AD, ağırlıklı olarak erken çocukluk döneminde meydana gelse de günümüzde çocukluk, ergenlik ve yetişkinlikte de oldukça sık karşımıza çıkmaktadır.

Semptomların uzun süreli hafifletilebilmesi adına önerilen tedavi yaklaşımları steroidall kremlerdir. Steroidal kremler, inflamasyonun ve meydana gelen tahrişin azalmasını sağlasa da uzun vadede tamamen iyileşmeyi sağlamaz bunun yanısıra birçok yan etkisi bulunmaktadır. Bu nedenle, günümüzde bitki kaynaklı ve doğal kaynaklı tedaviler için araştırmalar giderek artmaktadır.

Flavonoidler, anti-kanser, antioksidan, anti-enflamatuvar, yaşlanma karşıtı gibi birçok terapötik alanda gösterdiği faydalar ile öne çıkan fitobiyolojiklerdir. Flavonoidler,

yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve meyvelerde bulunurlar. Flavonoidlerin etki mekanizmalarının prensibi oksidatif stresin azaltılması ve bağışıklık sisteminin uyarılmasını temel alır. Çeşitli reaksiyonlarda indirgeyici ajanlar olarak hareket ederler ve oksidatif hasarı indirgeyici etki gösterirler.

Flavonoidlerin Flavon alt sınıfına dahil olan Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon) maydanoz, kereviz, soğan gibi sebzelerde, meyvelerde, papatya, kekik, fesleğen gibi bitkilerde bol miktarda bulunur. Bitki kökenli bir flavonoid olan apigenin, birçok alanda kendini gösteren tıbbi faydaları ile öne çıkan bir fitobiyoesektir. Literatürde yapılan çalışmalarda Apigenin flavonoidinin cilt bariyerini iyileştirmede ve cilt hastalıklarının meydana getirdiği lezyonları iyileştirmede etkili olduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, apigenin flavonoidinin anti-inflamatuar etkilerini değerlendirmek için yeniden yapılandırılmış insan epidermis (RHE-reconstructed human epidermis) modeli kullanılmıştır. Üç boyutlu hücre kültür modeli olan bu modelde verimli bir epidermal bariyerin üretimini sağlamak için, keratinositlerin tabakalaşmalarını destekleyen hava-sıvı ara yüzü koşullarında kersinositler kültüre edilmiştir. HaCaT hücreleri, in vitro AD özelliklerini taklit etmek için interlökin (IL)-4, IL-13 ve TNF- α ile uyarılmıştır. Ardından, apigenin flavonoidinin inflamasyon ve yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için belirlenen dozlarda ve sürede enkapsüle edilmiş ve edilmemiş olan apigenin ile uyarılmıştır. Elde edilen RNA ve hücre kültür süpernatantlarında atopik dermatitte etkisi olduğu bilinen sitokinler olan TSLP, IL-22, IL-6 seviyelerindeki değişiklikler ELISA ile ve IL-6, IL-1 β , TSLP gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiştir. Ayrıca atopik dermatitte oluşan yaralar üzerine apigeninin iyileştirici özelliğini incelemek için çizik migrasyon testi yapılmıştır.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, hava-sıvı ara yüzü koşullarında keratinositlerin IL-4, IL-13 ve TNF- α ile uyarım sonucunda RHE hücre kültür modelinin ve AD modelinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği görülmektedir.

Yeniden yapılandırılmış insan epidermis modeli oluşturulan hücre kültürü deneylerinde, enkapsüle apigenin uygulanan dozların serbest apigenin uygulanan dozlara kıyasla hücre canlılığı, yara iyileşmesi ve IL-6 gen ifadesi ve protein salımı üzerine çok daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Tez çalışmasında elde edilen sonuçlar ışığında, apigenin flavonoidinin atopik dermatit hastalığı üzerinde yara iyileşmesi ve anti enflamatuar özellikleri nedeni ile etkili bir biyoaktif madde olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar ışığında

apigeninin atopik dermatit gibi enflamatuvar hastalıklar için potansiyel bir tedavi aracı olabileceğini söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Apigenin, Atopik dermatit, flavonoid, keratinosit hücre kültürü, inflamasyon, yara iyileşmesi



ABSTRACT

EVALUATION OF APIGENIN'S ANTI-INFLAMMATORY AND WOUND HEALING EFFECTS USING ATOPIC DERMATITIS CELL CULTURE MODEL

Name SURNAME

Gözdem SAĞLAM

Master of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Esra BİRBEN

April 2025, 91 pages

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory skin disease that is quite common today, especially with the first symptoms occurring between the ages of 2 months and 5 years. Common symptoms include dry skin, itching due to dry skin, bleeding skin, lesions and clear discharge wounds. Symptoms are usually seen in the cheek area, behind the knees and hands. In addition to itching and scaly skin, skin color change is also frequently seen. Although symptoms decrease from time to time, recurrence is high and these symptoms can gradually become more severe. Although AD occurs predominantly in early childhood, it is also quite common in childhood, adolescence and adulthood today. The recommended treatment approaches for long-term relief of symptoms are steroidal creams. Although steroidal creams reduce inflammation and irritation, they do not

provide complete recovery in the long term and have many side effects. For this reason, research into plant-based and natural treatments is increasing today.

Flavonoids are phytochemicals that stand out with their benefits in many therapeutic areas such as anti-cancer, antioxidant, anti-inflammatory, anti-aging. Flavonoids are found in leaves, flowers, roots, and fruits. The principle of the mechanism of action of flavonoids is based on the reduction of oxidative stress and stimulation of the immune system. They act as reducing agents in various reactions and have a reducing effect on oxidative damage.

Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone), which is included in the Flavon subclass of flavonoids, is abundantly found in vegetables such as parsley, celery, onion, fruits, and plants such as chamomile, thyme, and basil. Apigenin, a plant-based flavonoid, is a phytochemical that stands out with its medical benefits in many areas. Studies in the literature have found that Apigenin flavonoid is effective in improving the skin barrier and healing lesions caused by skin diseases. Within the scope of the thesis study, a reconstructed human epidermis (RHE) model was used to evaluate the anti-inflammatory effects of apigenin flavonoid. In this model, which is a three-dimensional cell culture model, keratinocytes were cultured under air-liquid interface conditions that support the stratification of keratinocytes in order to ensure the production of an efficient epidermal barrier. HaCaT cells were stimulated with interleukin (IL)-4, IL-13 and TNF- α to mimic in vitro AD properties. Then, they were stimulated with encapsulated and unencapsulated apigenin at the determined doses and durations to evaluate the effects of apigenin flavonoid on inflammation and wound healing. Changes in the levels of TSLP, IL-22, IL-6, which are cytokines known to have an effect on atopic dermatitis, were determined by ELISA in the obtained RNA and cell culture supernatants, and IL-6, IL-1 β , TSLP were determined by real-time PCR. In addition, a scratch migration test was performed to examine the healing properties of apigenin on wounds formed in atopic dermatitis.

When all the results obtained are evaluated, it is seen that the RHE cell culture model and the AD model were successfully realized as a result of the stimulation of keratinocytes with IL-4, IL-13 and TNF- α in air-liquid interface conditions. In the cell culture experiments in which the reconstructed human epidermis model was created, it was determined that the doses applied with encapsulated apigenin were much more effective on cell viability, wound healing, and IL-6 gene expression and protein release compared

to the doses applied with free apigenin. In the light of the results obtained in the thesis study, it was shown that apigenin flavonoid is an effective bioactive substance on atopic dermatitis due to its wound healing and anti-inflammatory properties. In the light of these results, it can be said that apigenin may be a potential treatment tool for inflammatory diseases such as atopic dermatitis.

Keywords: Apigenin, Atopic dermatitis, flavonoid, keratinocyte cell line, inflammation, wound healing



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam sırasında hiçbir zaman desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi birikimi ile hep beni aydınlatan ve yüksek lisans sürecim boyunca yoluma ışık olan, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım danışman hocam sayın Prof. Dr. Esra BİRBEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Deneyletimde kullanmak üzere keratinosit hücrelerini temin etmemizi sağlayan ve tezim süresince desteğini esirgemeyen Prof. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN'a çok teşekkür ederim. Çizik testinde laboratuvarını kullanmama imkân sağladığı için Aysun KILIÇ SÜLOĞLU'na teşekkür ederim.

Çalışırken mutlu olmamı sağlayan, güzel enerjisiyle beni yüreklendiren, ihtiyacım olduğunda hep yardımına koşan Çiğdem ARAS'a, pozitifliği, bilgi birikimi ve desteğiyle hep yanımda olan Gülşen BAYRAK'a, iyi niyeti ve yardımlarıyla beni yalnız bırakmayan Muazzez ÇOBAN'a yanımda oldukları ve yüksek lisans sürecimi güzelleştirdikleri için çok teşekkür ederim. Yardımlarını esirgemeyen ve daima destek olan bölümümüzün değerli hocalarına teşekkür ederim.

İlk günden beri yanımda olan, sevgisiyle, destekleyici tavrıyla her zaman beni yüreklendirerek ilerlemi sağlayan eşim Berkay SAĞLAM'a, her zaman yanımda olarak her kararımı destekleyen, yalnız olmadığımı daima hissettiren, başarımın mimarı canım aileme ve beni her zaman izlediğini, gurur duyduğunu bildiğim bugünlere gelmemdeki en büyük desteğim canım anneme çok teşekkür ederim.

Gözdem SAĞLAM

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Deri.....	3
2.2. Atopik Dermatit.....	5
2.2.1 Atopik Dermatitte Tedavi Yaklaşımları.....	6
2.2.2. Atopik Dermatit Patogenezi ve Sinyal Yolakları.....	7
2.3. Flavonoidler.....	10
2.3.1. Apigenin.....	12
2.3.2. İnflamatuar Cilt Hastalıklarına Karşı Apigenin Mekanizması.....	13
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	13
3.1. İnsan Keratinosit Hücrelerinden Atopik Dermatit Modeli Oluşturulması.....	14

3.2 Keratinosit Hücrelerin Farklılaşmasının Gerçek Zamanlı PZR İle Gösterilmesi..	14
3.2.1. RNA İzolasyonu.....	15
3.2.2. Komplementer DNA (cDNA) Eldesi	15
3.2.3. SYBR Green Yöntemi ile Gen İfadelerinin Belirlenmesi.....	16
3.3 Apigeninin Peynir Altı Suyu (Whey) Proteini İzolatı ile Nanoenkapsülasyonu.....	17
3.4. Nanoenkapsüle Apigeninin Karakterizasyonu.....	18
3.4.1 Parçacık boyutu ve zeta potansiyeli ölçümleri.....	18
3.4.2. Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi.....	18
3.4.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	18
3.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	19
3.6. Apigeninin Sitotoksitenin Değerlendirilmesi	19
3.6.1. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	19
3.6.2. LDH testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	22
3.7. Hücrelerin Apigenin ile Uyarılması	24
3.8. İn Vitro Çizik Testi /Migrasyon Testi.....	24
3.9. İnflamatuar Sitokin Seviyelerinin Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR) ile Gösterilmesi.....	25
3.10. ELISA ile İnflamatuar Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi	26
3.11. İstatistiksel Analizler.....	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	27
4.1 İnsan Keratinosit Hücrelerinden Atopik Dermatit Modeli Oluşturulması: Keratinosit Hücrelerin Farklılaşmasının Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR) ile Gösterilmesi.....	27

4.2 Apigeninin Peynir Altı Suyu (Whey) Proteini İzolatı ile Nanoenkapsülasyonu Sonrasında Kapsülleme verimliliği (EE) ve yükleme kapasitesi (LC)'nin Belirlenmesi..	29
4.3 Nanoenkapsüle Apigeninin Karakterizasyonu.....	30
4.3.1. Parçacık boyutu ve zeta potansiyeli ölçümleri.....	30
4.3.2. Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi.....	32
4.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	33
4.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE).....	35
4.5. Apigeninin Sitotoksitenin Değerlendirilmesi.....	36
4.5.1. MTT Yöntemi ile Hücre canlılığının Belirlenmesi.....	36
4.5.2. LDH testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi.....	37
4.6. İn Vitro Çizik Testi /Migrasyon Testi Sonuçları.....	40
4.7. ELISA ile İnflamatuar Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi.....	43
4.8. Gerçek Zamanlı PZR ile Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi.....	45
5. YORUM.....	49
6. KAYNAKLAR.....	56
EKLER.....	62
EK 1 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	63

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Derinin katmanları.....	3
Şekil 2.2. Atopik dermatit hastalığının patogenezi [23].....	9
Şekil 2.3. Atopik dermatit hastalığında etkili sinyal yolları [24].....	9
Şekil 2.4. Flavonoidlerin genel yapısı ve ana flavonoid alt ailelerinin şeması [30].	11
Şekil 2.5. Apigenin kimyasal yapısı.	12
Şekil 2.6. Yüksek miktarlarda Apigenin içeren besin kaynakları [37]	12
Şekil 3.1. MTT testi çalışma prensibi.....	20
Şekil 3.2. LDH testi çalışma prensibi.....	22
Şekil 4.1. Keratinofit farklılaşmasının gen ifadesindeki değişiklikler ile gösterilmesi.....	28
Şekil 4.2. Miktar tayini için belirli dozlarla hazırlanan standart grafik	29
Şekil 4.3. a) 2 mg/ml ve b) 1 mg/ml enkapsüle API nanopartiküllerine ait (pH 7.4'te) zeta potansiyel grafikleri.....	31
Şekil 4.4. 1mg/ml ve 2mg/ml enkapsüle API nanopartiküllerine ait 5 ölçümün sonucunda elde edilmiş ortalama boyut (nm) grafiği.....	32
Şekil 4.5. a) PBS içerisinde çözülen peynir altı suyu izolatının FT-IR spektrumları 1 mg/ml b) 2 mg/ml enkapsüle apigenin FT-IR spektrumları.....	33
Şekil 4.6. a) 5,0 mg/mL WPI'de 1,0 mg/mL API ile hazırlanan nanodispersiyonun SEM görüntüsü b) 5,0 mg/mL WPI'de 2,0 mg/mL API ile hazırlanan nanodispersiyonun SEM görüntüsü.....	34
Şekil 4.7. Dispersiyonların moleküler ağırlıklarının SDS-PAGE deneyi ile tespiti.....	35
Şekil 4.8. Hücre canlılık analizi (MTT) sonuçları a) 24. saat, b) 48. Saat.....	36
Şekil 4.9. a) 24 ve b) 48. Saatlerde elde edilen % Sitotoksite değerleri (LDH Testi Sonuçları).....	38
Şekil 4.10. IL-4, IL-13 ve TNF- α ile Atopik Dermatit modeli oluşturulan HaCaT hücrelerinde enkapsüle (20E ve 40E) ve enkapsüle olmayan (20F ve 40F) apigenin dozlarının yara iyileşmesi üzerine olan etkisinin çizik testi ile belirlenmesi.....	40

Şekil 4.11. Stimulanlar aracılığı ile stimüle edilmeyen (atopik dermatit modeli oluşturulmamış olan) HaCaT hücrelerinde enkapsüle (20E ve 40E) ve enkapsüle olmayan (20F ve 40F) apigenin dozlarının in yara iyileşmesi üzerine olan etkisinin çizik testi ile belirlenmesi	41
Şekil 4.12. Çizik migrasyon testi ile elde edilen 24 saat ve 48 saatte yara iyileşme yüzdelерinin gösterilmesi a) IL-4, IL-13 ve TNF- α ile Atopik Dermatit modeli oluşturulan hücreler kullanılarak b) Sitokinler ile stimüle edilmeyen (atopik dermatit modeli oluşturulmamış) hücreler kullanılarak elde edilmiş sonuçlara ait grafikler.....	42
Şekil 4.13. IL-22 ELISA standart grafiği.....	43
Şekil 4.14. TSLP ELISA standart grafiği.....	44
Şekil 4.15. Hücre kültür süpernatantlarında IL-6 protein miktarındaki değişimlerin ELISA deneyi ile tayini.....	44
Şekil 4.16. Apigenin ile uyarım sonrasında Atopik dermatit patolojisinde önemli olan a) IL-6, b) IL-1 β , c) TSLP genlerin ifadesindeki değişimin gösterilmesi.....	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. MTT ve LDH deneylerinde kullanılan enkapsüle apigenin dozlarının hesaplanması.....	21
Çizelge 3.2. MTT ve LDH deneylerinde kullanılan enkapsüle olmayan apigenin dozlarının hazırlanması.....	21
Çizelge 4.1. 1mg/ml ve 2mg/ml enakapsüle apı nanopartiküllerine ait 5 ölçümün sonucunda elde edilmiş ortalama boyut (nm) ve ortalama zeta potansiyel (mv).....	32



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
M	Molar
mM	Milimolar
mL	Mililitre
μ	Mikro
g	Gram
μg	Mikrogram

Kısaltmalar

AD	Atopik Dermatit
RHE	Yeniden yapılandırılmış insan epidermis (reconstructed human epidermis)
API	Apigenin
HaCaT	İnsan Epidermal Keratinosit
cDNA	Komplementer DNA
PBS	Fosfat Tampon Çözeltisi
Whey	Peynir Altı Suyu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
IL	İnterlökin
FLG	Filaggrin

TNF- α	Tümör Nekroz Faktörü α
IFN- γ	İnterferon γ
DMSO	Dimetil Sülfoksit
Th2	Yardımcı T hücresi
NF- κ B	Nükleer Faktör-Kappa B
MAPK	Mitojenle Aktifleştirilen Protein Kinazlar
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
COX-2	Siklooksijenaz-2
NO	Nitrik Oksit
PGE2	Prostaglandin E2
TYK2	Tirozin Kinaz 2
XO	Ksantin Oksidaz
COX	Siklooksijen
LOX	Lipoksijenaz

1. GİRİŞ

Atopik dermatit (AD), günümüzde oldukça sık rastlanan çevresel ve genetik birçok faktöre bağlı olarak ortaya çıkan, kronik inflamatuvar deri hastalığıdır. Atopik dermatit hastalığında en sık karşılaşılan belirti rahatsız edici, uzun süreli kaşıntıdır ve ilk belirtileri genellikle erken çocukluk çağı olarak adlandırılan 5 yaşından önceki dönemde meydana gelir. AD, 'atopik yürüyüş' olarak adlandırılan birbirini takip eden atopik hastalıklar dizisinin ilk basamağında yer alır. Gelecek yıllarda meydana gelebilecek alerjik hastalıkların habercisi niteliği taşır ve astım, alerjik rinit gibi hastalıkların oluşma durumunu öngörebilmeyi sağlar. Atopik dermatit hastalığında klinikte karşılaşılan en önemli bulgular ciltte meydana gelen kuruluk ve kaşıntılı deri lezyonlarıdır.

Atopik dermatite özgü olarak nitelendirilen lezyonlu cilt yaraları, hastanın cildindeki kuruluk sonucu oluşan kaşıntı ile tetiklenir. Epidermal bariyerin yapısı ve işlevindeki bozulma cilt geçirgenliğini artırır, bu da derinin cilt mikrobiyomu ve çevresel faktörlere karşı direncini oldukça azaltır. Direncin azalması ile cilt, dış antijenlere ve inflamasyona daha açık hale gelir. İnflamatuvar semptomların hafifletilebilmesi amacıyla, klasik tedavi yaklaşımları olarak steroid ve steroid olmayan ilaçlar ile tedavi yöntemleri uygulanır. Bu tedavi yöntemlerinin semptomlar üzerindeki olumlu etkisi, görülen yan etkiler ve ilaçların uzun süreli kullanım sonucu direnç meydana gelmesi nedeniyle sınırlıdır.

Atopik dermatitte hastalığın önlenmesi ve tedavisi için doğal içerikler ile desteklenen tedavi yöntemleri geliştirmek oldukça önemli bir hale gelmiştir. Flavonoidler, antioksidan etkileri ve bağışıklık destekleyici özellikleri ile günümüzde hastalık tedavilerinde kullanılan ikincil bitki metabolitlerinin önemli bir sınıfıdır. Flavonoidler, yapılan araştırmalarda terapötik etkinlikleri nedeni ile çeşitli kronik hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde alternatif bir yaklaşım olarak sık araştırılan bir konu haline gelmiştir.

Flavonoid ailesinin bir üyesi olan Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon), kereviz sapı, nane, kekik, maydanoz, soğan, sarımsak, portakal, elma, papatya gibi çeşitli meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunur. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, apigenin flavonoidinin inflamatuvar belirteçleri ve moleküler hedefleri aşağı regüle ederek ciltte meydana gelen iltihabı indirgediği tespit edilmiştir. Çalışmalarda, apigenin flavonoidinin inflamatuvar ve immün yanıtta oldukça önemli olan MAPK, NF-κB ve Jak/STAT sinyal

yolakları aşağı dzenleyerek proinflamatuvar sitokinlerin, bnyeme faktörlerinin ve inflamatuvar mediatörlerin düzeylerini azalttığı görölmüştür.

Bu veriler ışıkında, apigeninin atopik dermatit hastalıkında oluşan kaşıntı, lezyonlu deri oluşumları gibi semptomları inflamatuvar yolakların baskılanması yolu ile iyileştirebileceği dűřünölmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında, apigenin flavonoidinin anti-inflamatuvar etkilerini değerlendirmek için yeniden yapılandırılmış insan epidermis (reconstructed human epidermis, RHE) modeli kullanıldı. Üç boyutlu hücre költür modeli olan bu modelde verimli bir epidermal bariyerin üretimini sağlamak için, keratinositlerin tabakalaşmalarını destekleyen hava-sıvı ara yüzü (Air Liquid Interface) koşullarında kersinositler költüre edildi. HaCaT hücreleri, in vitro AD özelliklerini taklit etmek için interlökin (IL)-4, IL-13 ve Tümör Nekroz Faktörü (TNF)- α ile uyarıldı. Ardından, apigenin flavonoidinin inflamasyon ve yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için belirlenen dozlarda ve sürede apigenin ile uyarıldı.

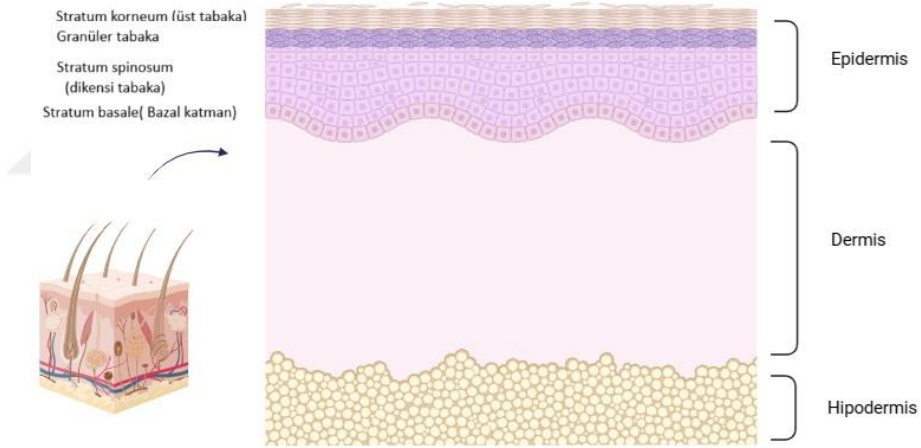
Elde edilen hücre költür süpernatantlarında atopik dermatitte etkisi olduğu bilinen sitokinler olan Timik Stromal Lenfopöietin (TSLP), IL-22 ve IL-6 sitokinlerin seviyelerindeki değeriklikler ELISA ile belirlendi. Apigenin ile uyarım sonrasında atopik dermatit patolojisinde önemli olan IL-6, IL-1 β , TSLP genlerin ifadesindeki değerim gerçek zamanlı PZR deneyi ile değerlendirildi. Ayrıca AD'nin en önemli semptomlarından olan kaşıntı sonucu oluşan cilt yaralarının iyileşmesi üzerine olan etkileri de yara iyileşme modeli kullanılarak değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Deri

Epidermis, deriyi oluşturan 3 tabakanın en dış katmanında yer alır. Yaklaşık 15-30 nm kalınlığındadır. Protein ve lipit tabakasından oluşur ve koruyucu bir kalkan görevi görerek vücudu çevresel uyarılara karşı savunur. Aynı zamanda, nemin tutulması ve bağışıklık sisteminin korunması gibi çeşitli işlevleri de bulunur.

Epidermis, asıl olarak keratinosit hücrelerinden oluşur. Bu hücrelerin yanısıra epidermiste yer alan hücreler; Langerhans hücreleri, melanositler ve Merkel hücreleridir. Bu hücreler, dayanıklılık sağlayarak derinin korunmasına yardımcı olur. Epidermis, farklılaşan keratinositler sayesinde daimî olarak yenilenir. Meydana gelen epidermal farklılaşma sırasında, keratinositler lipit üretir ve hücre dışında lipit açısından zengin tabakalar oluşturulur [1].



Şekil 2.1. Derinin katmanları, BioRender ile oluşturulmuştur.

Keratinositler, insan epidermisindeki temel hücre türleridir. Epidermiste ana bileşen olarak kabul edilir ve cilt bariyer fonksiyonlarında önemli rol oynarlar. Keratinositlerin, atopik dermatit hastalığının patolojisinde kritik bir rolü vardır. Vücudu çevresel uyaranlara, patojenlere ve oksidatif strese karşı korurlar. Oksidatif stres sonucunda oluşan aşırı tepki atopik dermatit, cilt kanseri, sedef hastalığı gibi önemli cilt hastalıklarına neden olur. Keratinositlerde inflamatuvar yanıtın gelişimini düzenleyen temel sitokinler olarak kabul edilen interferon (IFN)- γ ve TNF- α salgılanır [2].

Keratinositlerin temel işlevi ciltte meydana gelen hasarların onarımına destek olmak, cildin homeostazının düzenlenmesini sağlamak ve cildi dış etkenlere karşı korumaktır. Proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler gibi belirli proteinlerin salınması aracılığı ile hasar onarımı keratinosit hücreleri tarafından gerçekleştirilir. Ciltte kaşıntı ya da hasar yolu ile oluşan yaralanma bölgesine nötrofillerin ve makrofajların alınmasını sağlar [3].

Keratinositlerin yüzeyinde tanıma reseptörleri bulunur, bu reseptörlerin amacı patojenlerin tespit edilip tanınması ve patojenlere karşı bağışıklık tepkilerinin oluşturulmasıdır. Bozulan cilt bariyeri, patojenlerin hücre içi geçişini artırır bunun sonucunda doğuştan gelen bağışıklık sistemini harekete geçirir. Bağışıklık düzensizliği, filagrin (FLG) eksikliği, mikrobiyomda meydana gelen değişiklikler, stratum korneumda bulunan hücreler arası lipidlerin değişimi cilt bariyeri kusurlarına neden olur [4]. Filaggrin, önemli bir cilt bariyeri proteindir, keratin liflerinin bağlanması işlevi görür ve deriye direnç kazandırır. Filaggrin, serbest amino asitlere parçalanır ve parçalanmış aminoasitler cilt pH'ını koruma ve deride suyun tutulması için gereklidir. FLG eksikliği ciltte oluşan duyarlılığı kolaylaştırarak cilt iltihabını artırır [5,6]. Cilt bariyer proteinleri, geçirgen olmayan bir cilt bariyeri oluşturulması için çapraz bağlanmıştır. Cilt bariyerindeki deformasyonlar alerjene karşı duyarlılığı kolaylaştırır, duyarlılığın oluşması ile IgE seviyesi artar ve su kaybı oluşur [7].

Alerjenler, enfeksiyöz mikroorganizmalar gibi çeşitli faktörler tarafından tetiklenebilir. Enfeksiyona neden olan mikroplara, *Staphylococcus aureus* örnek gösterilebilir. AD hastalarının lezyonlarında sıklıkla gözlenir. Tetiklenme sonucunda, epidermal bariyerde değişiklikler meydana gelir ve yardımcı T hücresinde (Th2) bağışıklık tepkisinin düzensizliğine neden olur. Epidermiste kalınlaşma ve Th2 sitokinlerinin yukarı regülasyonu atopik dermatit hastalığında karakterizedir [8]. AD'de Th2 ve Th22 sitokinlerinin aşırı ekspresyonu ciltteki protein ve lipid içeriğini değiştirip cilt bariyerinin bozulmasına sebep olur.

2.2. Atopik Dermatit

Atopik dermatit, halk arasında sıklıkla egzama olarak bilinen, dünyada oldukça fazla görülen kronik inflamatuvar bir deri rahatsızlığıdır. Literatürde yapılan çalışmaların istatistikleri göz önüne alındığında, çocuklarda görülme oranı yaklaşık %11 ila %20 iken, yetişkinlerde görülme oranı ise %5 ila 8 olan bir hastalıktır [9].

Genellikle 5 yaşından önce erken çocukluk döneminde ilk belirtileri meydana gelir. Bu hastalığın sık görülen semptomları hastanın yaşam kalitesini olumsuz etkileyen kuru cilt, hastaya rahatsızlık veren uzun süreli kaşıntı ve pullu sıyrıklardır. Görüldüğü yaş aralıklarına göre kaşıntı ve lezyonların etkili olduğu bölgeler değişiklik gösterebilir. Tipik olarak dirsek, diz, yüz ve boyun bölgelerini etkiler. Atopik dermatiti etkileyen birkaç alt tip bulunur. Bu alt tipler, klinik, demografik ve moleküler parametreler sonucu oluşan alt tiplerdir [10].

Atopik dermatit vakaları sıklıkla bebeklik ve çocukluk çağında görülür ancak yetişkinlik döneminde de meydana gelebilen bir hastalıktır. Günümüzde hastalığın seyri incelendiğinde yetişkinlerde görülme sıklığında da artış görülmektedir. Atopik dermatitte meydana gelen semptomlar, meydana geldiği yaş aralıklarına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir.

İnfanıl vakalar 2 yaşından önceki bebeklik dönemini kapsar. Hastalarda sıklıkla görülen semptomlar yüzde, özellikle yanak bölgesinde ve saçlı deride kızarıklık, rahatsızlık veren kaşıntı ve ödemdir.

Çocukluk döneminde vakalarda, bebeklik çağında görülen semptomlara kıyasla nispeten daha soluk kızarıklıklar oluşur. Lezyonların belirginliği daha azdır. Semptomlar

çoğunlukla dirsek ve diz bölgelerini etkiler. Bu vakalarda, hastalığın seyrinin kronik vakaya dönüşme olasılığı yüksektir.

Yetişkinlik döneminde meydana gelen vakalarda ise genellikle sadece elleri etkileyen egzama türü ile semptomlar ortaya çıkar. Hastalarda kuru cilt, kaşıntı ve kızarıklık belirtilerine rastlanır. El egzaması dışında vücutta gövdenin üst kısmını, saçlı deriyi etkilediği vakalara da rastlanmıştır [11].

Atopik dermatit hastalarında ‘atopik yürüyüş’ adı verilen astım, alerjik rinit gibi kronik hastalıkların da tetiklendiği hastalık dizisi de meydana gelebilmektedir. Bu dizinin ilk ortaya çıkan hastalığı atopik dermatittir. Literatürdeki araştırmalar göz önüne alındığında, astım, alerjik rinit veya besin alerjisi olan ebeveynlerin çocuklarında AD gelişme riski 1,5 kat daha fazladır. Ebeveynlerden birinde atopik dermatit varsa, çocuklarında AD gelişme riski 3 kat artarken, her iki ebeveyn de hastalığın bulunması bu riski 5 kat artırır [12].

Atopik dermatitin semptomlarının oluşmasının ardından şiddetli besin alerjisi geliştirme riski doğabilir. Yapılan bir araştırmada atopik dermatit tanısı konulan çocuklar sağlıklı yaşlıları ile kıyaslandığında besin alerjisi geliştirme olasılıklarının altı kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir [13]. Atopik dermatit şiddeti arttıkça astım meydana gelme riski de artmaktadır.

2.2.1 Atopik Dermatitte Tedavi Yaklaşımları

Atopik dermatit hastalığına özgü olarak nitelendirilen lezyonlu cilt yaraları, hastanın cildindeki kuruluk sonucu oluşan kaşıntı ile tetiklenir. Epidermal bariyerin yapısı ve işlevindeki bozulma cildin dış etkenlere karşı geçirgenliğini artırır, bu da derinin cilt mikrobiyomu ve çevresel faktörlere karşı direncini oldukça azaltır. Direncin azalması ile birlikte cilt, dış antijenlere ve inflamasyona daha açık hale gelir.

Atopik dermatit tanılı hastaların büyük bir çoğunluğu *S. aureus* ile kolonizedir ve bu da ciltte oluşan enfeksiyon olasılığını artırır ve bu durum deride meydana gelen sıvı lezyonların da alevlenmesine yol açabilir [14]. Atopik dermatitte hastaların karşılaştığı uzun süreli kaşıntı, kuruluk, pullu deri gibi semptomları hafifletmek amacıyla, doktorların önerisi ile çoğunlukla steroid ve steroid olmayan ilaçlar tercih edilmektedir. Atopik dermatit hastalığında ilk tercih edilen tedavi yaklaşımı olan topikal kortikosteroidler, semptomlar üzerinde hızlı sonuç vererek kısa süreli iyileşme gösterse de inflamatuvar bağışıklık yanıtını azaltır [15].

Steroid potansiyelleri esas alındığında çok düşükten ultra yükseğe kadar değişen yedi steroid potansiyeli vardır. Steroid çeşitlerinin kullanımı semptomların şiddetine bağlı olarak değişebilmektedir. Doktorların tavsiyelerine göre, lezyonlar büyük oranda iyileşene kadar topikal steroidler günde en fazla iki kez uygulanır. Steroidal ilaçların yan etkileri sebebiyle günlük kullanım miktarı, kullanım süresi gibi faktörlere dikkat edilmesi semptomların iyileşmesi ve hastanın sağlığı için önemlidir. Aynı zamanda doktor tarafından tavsiye edilen steroidün etki gücü, kullanım miktarını da değiştirmektedir. Meydana gelebilecek yan etkilerin olabildiğince en aza indirilmesi amacıyla steroidlerin kullanımının sınırlandırılması önemlidir. Yan etkiler arasında ciltte meydana gelen çöküntüler ve renk değişikliği, damarlarda genişlemeler, çatlaklar, pigment bozukluğu veya pigment kaybı bulunur, ayrıca doktor tavsiyesi dışında ve doğru şekilde uygulanmayan steroid, cilt kanserine de neden olabilmektedir. [16].

Hastanın semptomları üzerinde steroidal tedavinin etkinliği ve başarısı değerlendirildiğinde önemli yan etkiler ve uzun süreli kullanım sonucunda direnç gelişmesi nedeniyle oldukça sınırlıdır. Bunun yanı sıra, tedavi cilt bariyerinde oluşan deformasyonu tedavi süresince iyileştirse de tedavi sona erdiğinde hastalığın tekrarlama riski artar. Steroidal tedaviler atopik dermatit tedavisinde kalıcı bir etki göstermeyebilir. Steroidal tedavilerde meydana gelebilen yan etkiler ve uzun süreli kullanımın mümkün olmayışı nedeni ile AD tedavisinde ve hastalığın önlenmesinde kimyasal olmayan, doğal içeriklerle desteklenen yeni yöntemler geliştirmek günümüzde oldukça önemlidir.

2.2.2 Atopik Dermatit Patogenezi ve Sinyal Yolakları

a) Atopik Dermatitte NF-κB Sinyal Yolu

Nükleer faktör-kappa B (NF-κB), immün yanıtta önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Atopik dermatit hastalığında inflamatuvar ve immün yanıtların oluşturulmasında önemlidir. NF-κB sinyal yolunun atopik dermatitteki kritik rolü sebebi ile bu sinyal yolunu hedef alan inhibitör etkili tedaviler de günümüzde sıklıkla araştırılan konular arasındadır. NF-κB, mitojenle aktiveleştirilen protein kinazlar (MAPK'ler) aracılığı ile düzenlenmektedir. Çekirdekte bulunan gen transkripsiyonu NF-κB sayesinde aktive edilir, hedef genlerdeki promotörleri aktive ederek sitokin artışına sebep olur. Bu sinyal yolu inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde ve hastalığın şiddetinde kritiktir [17].

NF-κB, proinflamatuvar sitokinler olan IL-6, IL-1β ve TNF-α salgılanmasını artırır. Sitokinlerde meydana gelen artış sonucunda alerjik enflamasyonda artış görülür ve deri

iltihabının tetiklenmesinde rol oynar. Salgılanan sitokinler ve kemokinler bariyer disfonksiyonu için önemlidir [18]. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) tarafından sentezlenen nitrik oksit (NO) ve prostaglandin E2 (PGE2), inflamatuvar yanıtın temel araçlarıdır. Bu sitokinler, inflamatuvar yanıtı ve doku disfonksiyonunu teşvik eder.

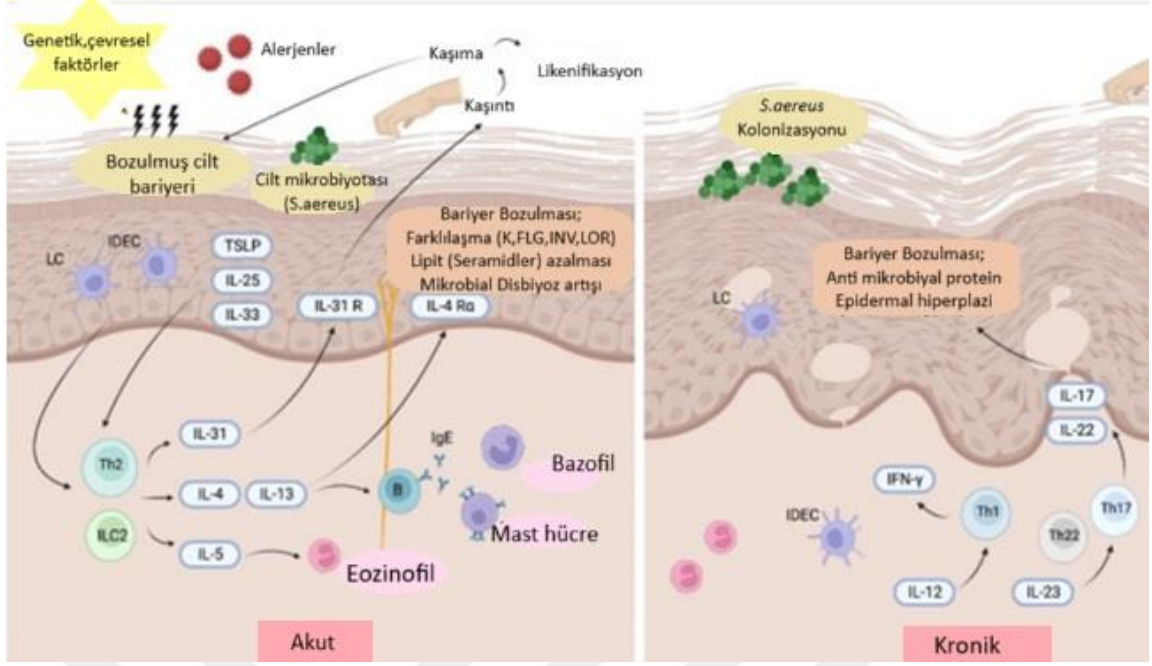
b) Atopik Dermatitte JAK-STAT Sinyal Yolu

JAK-STAT sinyal yolu, proteinler arasında etkileşim kurulabilmesi için bağlayıcı niteliktedir. Janus kinaz (JAK) inhibitörleri atopik dermatit hastalığı ile ilişkilendirilen sitokinleri aşağı regüle eden inhibitör işlevi görür. Bu sitokinler (IL-4, IL-5, IL-13, IL-12) bağışıklık düzenlenmesi ve homeostatik süreçlere katkıda bulunur. Araştırmalarda, JAK inhibitörlerinin hastalığın önemli bir semptomu olan kaşıntıyı azaltmada etkili olduğu gözlemlenmiştir.

JAK kinaz dört reseptörle ilişkili kinaz içerir, bunlar; JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2 (tirozin kinaz 2)'dir. STAT ailesi ise yedi protein içerir, bu proteinler; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6'dır. JAK'lar doğrudan tip I/II sitokin reseptörlerine bağlanır ve bu reseptörlerin aktivasyonunun sağlanmasına yardımcı olur. Atopik dermatit hastalığında IL-25, IL-33 ve TSLP gibi sitokinlerin salınması, IL-4, IL-5, IL-13 ve IL-31 gibi Th2 sitokinlerinin ekspresyonunun artmasına neden olur [19] (Şekil 2.2).

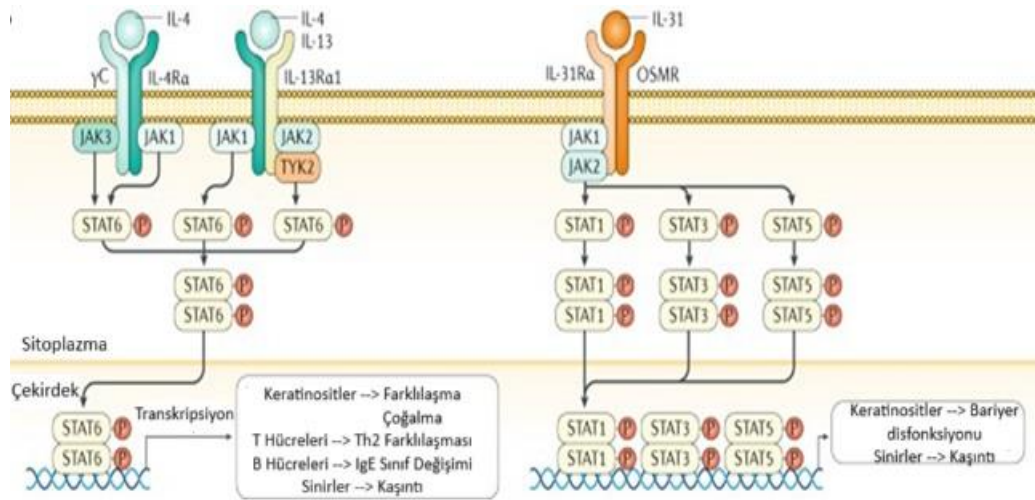
Sinyal yollarında oluşan değişkenliğe bağlı olarak Farklı JAK'lar, JAK-STAT farklı alt birimlerine bağlanma eğilimi gösterir. Örneğin JAK1, IL-4Ra alt birimine, JAK3, γ c zincirine ve TYK2 ise IL-13Ra alt birimlerine bağlanır. IL-4 aracılı yanıtın oluşmasında ise IL-4, tip I IL-4R'ye bağlanır, bunun sonucunda JAK1 ve JAK3'ün fosforilasyonunu gerçekleştirir, bunlar da IL-4Ra ve STAT6 aktivasyonuna yol açar [20] (Şekil 2.3).

Fosforile edilen STAT6 daha sonra dimerize olarak ve IL-4'e duyarlı genlerin spesifik DNA dizilerine bağlanarak transkripsiyon faktörü olarak görev yapar. IL-31'in hücreler arası sinyalleri JAK-STAT yolu, MAPK'lar ve PI3K-AKT yolu tarafından iletilir. IL-31, IL-31Ra-OSMR β kompleksine bağlanarak JAK1 ve JAK2 aktivasyonunu tetikler, böylece STAT3, STAT5 ve daha az derecede STAT1 transkripsiyonel aktivitesini uyarır ve ilişkili genlerin transkripsiyonu artar [21,22] (Şekil 2.3).



Şekil 2.2. Atopik dermatit hastalığının patogenezi [23] sayılı kaynaktan Türkçe çeviri yapılarak alınmıştır.

AD'nin kronik fazı sırasında, Th17 ve Th22 sitokinleri, epidermal hiperplaziye uyaran proinflatuar sitokinlerin yukarı regülasyonu yoluyla lokal enflamasyonu modüle eder. Seçici JAK inhibitörleri, STAT3 aktivasyonunu yukarı yönde hedefleyerek atopik dermatit hastalığında Th17 immün tepkisinin inhibisyonu üzerindeki etkisini gösterebilir.



Şekil 2.3. Atopik dermatit hücre sinyal yolları [24] sayılı kaynaktan Türkçe çeviri yapılarak alınmıştır.

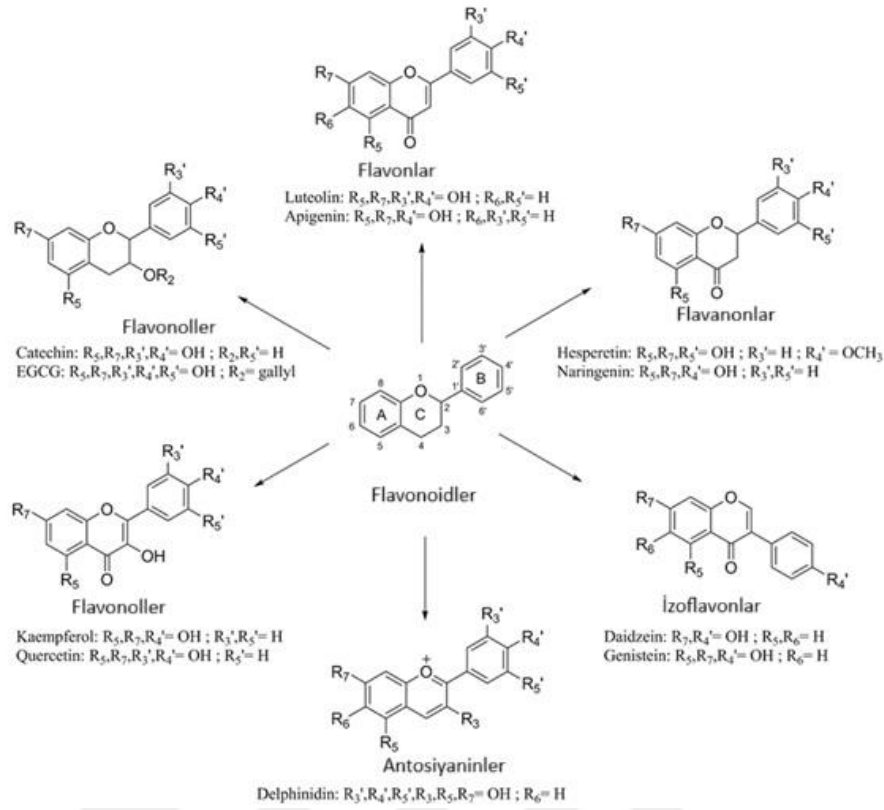
2.3. Flavonoidler

Flavonoidler, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve meyvelerde farklı konsantrasyonlarda bulunan sekonder bitki metabolitlerinin önemli bir sınıfıdır. Bitkilerin ikincil metabolitleri olarak oluşan flavonoidler, biyolojik süreçlerde ve çevresel faktörlere verilen yanıtta önemli roller oynar [25]. Tüm bitkilerde flavonoidlerin farklı bir alt sınıfı karşımıza çıkar.

Flavonoidlerin bitkiler üzerindeki etkilerine bakıldığında, abiyotik ve biyotik streslere karşı koruma, hücre büyümesini düzenleme gibi işlevleri bulunur. İnsanlar üzerinde etkileri incelendiğinde bu bileşikler anti-inflamatuar, antikanser, yaşlanma karşıtı, kalp ve beyin sağlığını koruyucu, bağışıklık sağlama, antibakteriyel ve antiviral özellikler gibi birçok tıbbi faydası ile dikkat çekmektedir [26,27].

Flavonoidlerin etki mekanizmalarının temeli oksidatif stresin azaltılması ve bağışıklık sisteminin uyarılmasına dayanır. Fitokimyasal olan flavonoidler, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin plazma seviyelerini düşürebilir, trombosit agregasyonunu inhibe edebilir ve hücre çoğalmasını azaltabilir [28].

Flavonoidler moleküler olarak C₆-C₃-C₆ iskelet yapısından oluşur. Flavonoidlerin düzeninin temeli, piran halkasıyla kaynaşmış bir fenil halkası ve piran halkasının 2. pozisyonunda bulunan başka fenil halkasına dayanır [29]. Flavonoidler, esas olarak flavanoller, flavanonlar, flavonoller, isoflavonlar, flavonlar ve antosiyaninler olmak üzere 6 alt gruba ayrılmaktadır. Bu grupların oluşumunda kimyasal yapı ve karbon halkasının oksidasyonları etkilidir (Şekil 2.4).



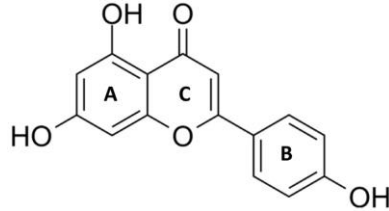
Şekli 2.4. Flavonoidlerin genel yapısı ve ana flavonoid alt ailelerinin şeması [30] sayılı kaynaktan Türkçe çeviri yapılarak alınmıştır.

Terapötik ajanlar olan flavonoidler, anti-inflamatuar, anti-mutajenik, anti-tümör ve antioksidan özellikleri ile tıbbi yarar sağlar. Patolojik süreçlerde yer alan ksantin oksidaz (XO), siklooksijenaz (COX), lipoksijenaz (LOX) ve fosfoinositid 3-kinaz dahil olmak üzere çeşitli enzimlerin aktivitelere etki ederler [31].

Flavonoidler, çeşitli reaksiyonlarda indirgeyici ajanlar olarak hareket ederek antioksidan etki gösterebilirler. Antioksidanlar, oksidatif hasarı indirgeyen bileşiklerdir. Flavonoidler reaktif oksijen türlerini (ROS) indirgeyebilir. ROS, hücre içi haberci görevi görür. Protein, lipid gibi moleküller ile reaksiyona girer ve bu reaksiyon sonucunda oksidatif strese yol açar. Hücrede fazla miktarda bulunan ROS aynı zamanda DNA ve RNA'da hasara sebep olur. Flavonoidlerin yapısında bulunan B halkasındaki hidroksil grubu ve 4-okso ile 2,3-çift bağı sayesinde oksidatif stresin indirgenmesi sağlanır [32]. Antioksidan görevi görmesi nedeni ile flavonoid bakımından zengin besinlere günlük besin alımında daha çok yer verilmesi gerekmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda da flavonoidlerin antioksidan etkileri nedeni ile potansiyel terapötik kullanımı önemli hale gelmiştir [33].

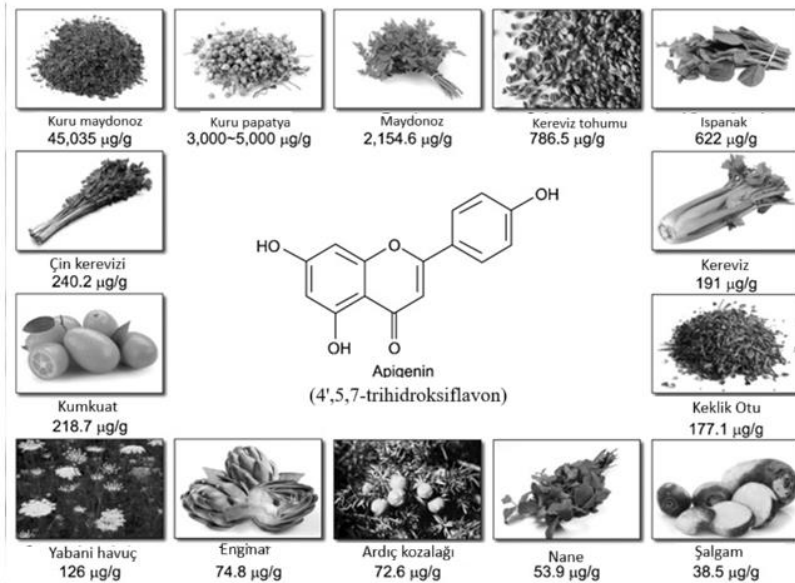
2.3.1. Apigenin

Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon), fitokimyasal bileşikler olan flavonoidlerin alt sınıfına ait doğal bir bileşiktir. Apigenin biyoflavonoidi, flavonoidlerin altı alt sınıfından flavon alt sınıfına dahildir. Apigenin, $C_{15}H_{10}O_5$ kimyasal formülüne sahip organik, sarı renkli bir bileşiktir. Moleküler ağırlığı 270,24 g/mol, erime sıcaklığı ise 347,5 °C'dir [34].



Şekil 2.5. Apigenin kimyasal yapısı

"Apigenin" adı, maydonozgiller olarak adlandırılan Apiaceae ailesinin kereviz, havuç, maydonoz gibi bitkileri içeren Apium cinsinden gelir [35]. Apigenin, sebzelerde (maydonoz, kereviz, soğan), meyvelerde (portakal), bitkilerde (papatya, kekik, mercanköşk, fesleğen) ve bitki bazlı çay, bira ve şarap gibi içeceklerde zengin olarak bulunur [36] (Şekil 2.6). En zengin kaynaklar kurutulmuş formlardır. Papatya çayında önemli miktarda bulunur. Organik, bitki kökenli bir flavonoid olan apigenin, birçok alanda kendini gösteren tıbbi fayda sağlayan önemli bir fitobileşiktir.



Şekil 2.6. Yüksek miktarlarda Apigenin içeren besin kaynakları [37] sayılı kaynaktan Türkçe çeviri yapılarak alınmıştır.

2.3.2 İnflamatuvar Cilt Hastalıklarına Karşı Apigenin Mekanizması

Yano ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada Apigenin fare modelinde serumdaki IgE ve interferon- γ düzeylerini azaltmıştır. Üstelik apigenin, kontak dermatit hastalığında temas duyarlaştırıcı olan pikrilklorürün oluşturduğu cilt bariyer bozukluğu ve lezyonları hafifletmiştir. Ayrıca apigenin, IL-4 ile uyarılmış fare dalak hücrelerinde STAT6 fosforilasyonunu baskılamıştır [38].

İnsan mast hücre hattında (HMC-1) apigenin uyarımının IL-31 gen ifadesi düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. İnsan mast hücrelerinde apigenin, κ B kinaz inhibitörü, κ B inhibitörü ve p65/NF- κ B ve faktör- κ B (NF- κ B) sinyal yolağı proteinlerini indirgemıştır [30]. Çalışma sonucunda, apigenin flavonoidinin MAPK, NF- κ B ve Jak/STAT sinyal yollarını indirgeyerek proinflamatuvar sitokinlerin düzeylerini azaltarak atopik dermatitte oluşan semptomları iyileştirebileceği sonucuna varılmıştır.

Kaşıntı ile ilgili yapılan çalışmalarda; Ovalbumin ile tetiklenen fare modelinde apigenin, NF- κ B yolunu indirgeyerek ve IgE ve STAT1 ekspresyonunu azaltarak Th1/Th2 hücrelerinin dengesinin korunması için düzenlediği görülmüştür. Ayrıca apigenin, T hücrelerinde eksprese edilen IFN- γ ifadesini düzenleyerek Th1 cevabını arttırmıştır [39]. Apigenin, sedef hastalığı modelinde sitokin seviyelerini azaltarak olumlu bir etki göstermiştir. Apigenin ile tedavi edilen ciltte cilt bariyerini iyileştirme etkileri gözlemlenmiştir. Apigenin ayrıca stratum korneumun nem seviyesini artırarak cildin durumunu iyileştirmiştir. Bunun yanısıra apigeninin, fare modellerinde filaggrin, involucrin ve lorikrin gibi cilt yapısal proteinlerinin sentezini etkilediği gösterilmiştir [31].

Dendritik hücrelerde apigenin ve lipopolisakaritin (LPS) birlikte uygulanmasının, TNF- α mRNA ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca apigenin, hem LPS ile muamele edilen hem de muamele edilmeyen gruplarda IFN- γ , IL-6, IL-1 β , IL-23 ve IL-10 dahil olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin seviyesini baskılamıştır [40].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. İnsan Keratinosit Hücrelerinden Atopik Dermatit Modeli Oluşturulması

Atopik dermatit hücre modeli oluşturmak amacı ile HaCaT hücreleri 75 cm² flask içerisinde %10 FBS ve %1 Pen/Strep içeren yüksek glikozlu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich) kullanılarak %80-90 konfluent olana kadar çoğaltılmıştır. 24 kuyucuklu plakalara yerleştirilmiş olan 0,40 µm membran gözenek boyutu ve 0,6 cm² yüzey alanına sahip transwell membran üzerine 1 cm²'de 10 µg olacak şekilde PBS içinde çözülmüş kolajen (Thermo Fisher Scientific) eklenmiştir. Kolajenin membran yüzeyinde katman oluşturması amacı ile steril hücre kabini içinde iki saat bekletilmiştir. İki saatin sonunda, 100 µl PBS ile iki kere yıkanmıştır. Ardından daha önceden 75 cm²'lik flaska ekilen ve konfluent hale gelen hücreler Tripsin EDTA (Serena) ile flask yüzeyinden kaldırılıp, hücreler tripan mavisi ile boyanarak sayım yapıldıktan sonra her kuyucukta 1 x 10⁵ hücre olacak şekilde 24 kuyucuklu plaklara yerleştirilmiş olan kolajen ile kaplanmış membranlar üzerine ekilmiştir. Farklılaştırma için hava-sıvı arayüzü (ALI) kültür modeli kullanılarak hücreler 14 gün süreyle sadece alt kısımdan 300 µl besiyeri ile güneşirni besleyerek, üstten deride olduğu gibi hava ile temas edecek şekilde bırakılmak suretiyle farklılaştırılmıştır. Negatif kontrol olarak ise hem alttan 300 µl, hem de üstten 100 µl besiyeri ile beslenen koşullarda inkübe edilen kuyucuklar kullanılmıştır.

3.2 Keratinosit Hücrelerin Farklılaşmasının Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR) ile Gösterilmesi

14 gün süre ile hava-sıvı arayüzü (ALI) kültür modeli kullanılarak farklılaştırılan HaCaT hücrelerinin farklılaşıp farklılaşmadığını tespit etmek için 14. günün sonunda RNA izolasyonu yapılmıştır ve farklılaştırma için belirteç niteliğinde olan genlerin ifadelerindeki değişim gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiştir. RNA izolasyonu ve cDNA eldesi daha önce literatürde yer aldığı şekilde ticari kitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

RNA izolasyonu (Invitrogen-PureLink) için kontrol koşulu ve ALI kuyucuğuna 100 µl tripsin konularak 2 dakika etüvde inkübe edilmiştir.

Etüvden alınmasının ardından tripsini nötralize etmek amacı ile FBS içeren 200 µl DMEM besiyeri eklenmiştir, kuyucuklar pipet yardımı ile iyice kazınarak ependorfa alınmıştır. 12.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir ardından süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra aşağıdaki protokol kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 RNA İzolasyonu

1-Hücreler, %1 olacak şekilde β-Merkaptoetanol ilave edilmiş, 300 µl lizis tamponu ile pipetle çekip bırakmak suretiyle parçalanmıştır.

2-Hücre homojenatı üzerine 1 volüm %70 etanol ilave edilmiş ve etanol ilavesinin ardından ependorf karıştırıcı yardımı ile homojen hale gelene kadar karıştırılmıştır.

3-Kolon yerleştirilmiş toplama tüpünün üzerine homojenat eklenmiştir. 12,000 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından toplama tüpündeki sıvı boşaltılmıştır ve aynı toplama tüpüne kolon geri yerleştirilmiştir.

4-Toplama tüpündeki sıvı boşaltılıp ve üzerine 700 µl yıkama tamponu ilave edilmiştir.

5-Tüpler 12,000 x g'de 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilmiştir.

6-Kolon yeni bir toplama tüpü üstüne yerleştirilmiştir ve üzerine 500 µl yıkama tamponu-2 ilave edilmiştir. 12,000 x g'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmış ve aynı toplama tüpüne kolon geri yerleştirilmiştir.

7-Toplama tüpündeki sıvı boşaltılmıştır ve üzerine hiçbir şey ilave edilmeden 12,000 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü ve süpernatant atılmıştır.

8-Kolon steril 1.5 ml ependorf tüp üzerine alınmıştır ve üzerine 50 µl RNaz içermeyen su ilave edilerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edilmiştir.

9-Ardından 12,000 x g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.

Elde edilen RNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C de muhafaza edilmiştir.

3.2.2 Komplementer DNA (cDNA) Eldesi

RNA izolasyon protokolünde anlatıldığı şekilde izole edilen RNA örneği komplementer DNA (cDNA)'ya dönüştürülmüştür. RNA izolasyonundan elde edilen örneklerin üzerine 20 µl'lik reaksiyon karışımı için 1 µl oligo dT, 10 µl 2X Reaksiyon tamponu, 2 µl RNase H⁺ reverse transkriptaz ve 1/5 oranında sulandırılmış cDNA örneği eklenmiştir. Son hacim 20 µl olarak oluşturulmuştur. Deney sırasında örnekler buz üzerinde çalışılmıştır. Tüpler önce 25°C'de 10 dakika, 37 °C'de 30 dakika ardından 85°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Bu döngünün ardından komplementer DNA (cDNA) 'ların oluşumu sağlanmıştır.

7 µl RNA örneği (1:5 oranında sulandırılmış)

10 µl 2X Reaksiyon tamponu

2 µl RNase H⁺ reverse transkriptaz

1 µl oligo dT

20 µl toplam reaksiyon karışımı

3.2.3 SYBR Green Yöntemi ile Gen İfadelerinin Belirlenmesi

Keratinosit farklılaşması için önemli genler olan sitokeratin14, lorikrin ve fillagrin genlerinin ifade düzeyleri SYBR Green yöntemi ile belirlenmiştir. Yukarıdaki protokolda belirtilen şekilde hazırlanan cDNA örnekleri (20µl) 1:10 oranında nükleaz içermeyen su ile sulandırılmış ve her bir reaksiyonda sulandırılmış olan cDNA örneklerinin 2 µl'si kullanılmıştır. Her bir koşul en az iki kez tekrar edilecek şekilde karışımlar aşağıda belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

Reaksiyon karışımı

2 µl cDNA

0,30 µl ileri primer

0,30 µl geri primer

2,5 µl nükleaz içermeyen su

5 µl 2X SYBR Green Karışımı

Belirlenen genlerin yanı sıra örneklerin miktar açısından normalizasyonu için “housekeeping” gen olarak bilinen uzama faktörü 1- α (EF-1 α) geni kullanılmıştır.

PRİMERLER

Sitokeratin 14 F 5' - CCGACACCTTCTCTTCACTCA -3'

Sitokeratin 14 R 5' - AGGAGCCCTTCATGGAGCTG -3'

Lorikrin F 5' - ACGTCTCCTCGCAGCAGG -3'

Lorikrin R 5' - CTATTTGGACGGCCAGGT -3'

Filaggrin F 5' - CACAAGATTCTGCGTATCACTCAGG -3'

Filaggrin R 5' - GCCTTTCAGTGCCCTCAGATTG -3'

EF-1 α F 5' - ATGGGTAAGGAAGACAAGAC -3'

EF-1 α R 5' - GGAGGTACCAGTCATCATGTT -3'

3.3 Apigeninin Peynir Altı Suyu (Whey) Proteini İzolatı ile Nanoenkapsülasyonu

İlk olarak literatürde yer alan yöntemde belirtildiği şekilde peynir altı suyu izolatu (WPI) 10 mg/mL olacak şekilde 4 °C'de gece boyunca deiyonize su içerisinde hidratlandıktan sonra 10 mg/mL WPI solüsyonuna 0,6 ve 1,0 mg/mL apigenin ilave edilmiştir. Karışımın pH'ı 2,0 mol/L KOH solüsyonu kullanılarak 13,0'a ayarlanmış ve 5 dakika karıştırılmıştır.

Süre sonunda pH 10.0'a ayarlandıktan sonra karışım 30 dakika daha karıştırılmıştır ve 1.0 M HCL ile titre edilerek pH 7.0'a ayarlanmıştır. Numuneler 10.000 x g'de ve 4 °C'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüjden sonra oluşan çökelti DMSO ile çözülmüştür ve kapsüllenmemiş apigenin miktarını belirlemek için 337 nm'de absorbans ölçülmüştür. Miktar tayininde standart grafik hazırlamak için DMSO içinde çözülmüş apigenin içeren standart çözeltilerden elde edilen absorbans değerleri kullanılmıştır. Standart grafik hazırlanması için dozlar; 0,025 mg/ml, 0,050 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml ve 1 mg/ml olarak belirlenmiştir.

Kapsülleme verimliliği (EE) ve yükleme kapasitesi (LC) daha sonra aşağıdaki denklemlere göre belirlenmiştir.

%EE= Toplam apigenin (mg) – enkapsüle edilmemiş apigenin (mg) / toplam apigenin (mg) * 100

LC= Toplam apigenin (mg) – enkapsüle edilmemiş apigenin (mg) / toplam peynir altı suyu (g).

Verimlilik analizleri sonucunda ikinci deneme olarak, 5 mg/ml peynir altı suyu proteini ve 1 mg/ml, 2mg/ml Apigenin dozları denenmiştir.

3.4. Nanoenkapsüle Apigeninin Karakterizasyonu

3.4.1 Parçacık boyutu ve zeta potansiyeli ölçümleri

pH 7.0 dispersiyonlarının parçacık boyutu dağılımlarını belirlemek için dinamik ışık saçılımı (DLS) kullanılmıştır. Hem parçacık boyutu hem de zeta potansiyeli ölçümleri, bir Zetasizer Nano-ZS serisi cihazla gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyel ölçümleri için 1 mg/ml ve 2 mg/ml enkapsüle apigenin örnekleri kullanılmıştır.

3.4.2. Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi

Apigenin ve WPI arasındaki moleküler etkileşimleri incelemek için FT-IR spektroskopisi kullanılmıştır. 2 mg/ml enkapsüle apigenin ve PBS içerisinde çözülen peynir altı suyu izolatu FT-IR spektrometresinin ZnSe kristali ile donatılmış düz üst plakasına doğrudan yerleştirilmiş ve her numunenin taramasından 400–6000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ve 4 cm⁻¹ çözünürlükte FT-IR spektrumları oluşturulmuştur.

3.4.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri Hacettepe Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (HUNITEK) yapılmıştır. Hazırlanmış 1 mg/ml ve 2 mg/ml konsantrasyonlarda enkapsüle edilmiş apigenin örneklerinin boyut ve şekilleri SEM ile incelenmiştir.

3.5. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

5 mg/mL WPI içeren dispersiyonların pH döngüsü işleminden önce ve 2 mg/mL apigenin ile kapsüllemeden sonra moleküler ağırlık değişikliklerini analiz etmek için SDS-PAGE kullanılmıştır. Her örnekten alınan miktar eşit hacimde Laemmli tamponu (50,0 mg/mL beta-merkaptolanol içeren) ile karıştırıldıktan sonra yüksek ısıda 10 dakika denatüre edilmiştir. Eşdeğer miktarda protein içeren numuneler, %4-20 Mini Protean Tris-Glisin jeli (Bio-Rad) kullanılarak analiz edilmiştir. 200 V'de 30 dakika elektroforezden sonra jelin fiksasyon edilmesi amacı ile %50 Metanol (MeOH), %10 Asetik asit (HoAC), %40 dH₂O içeren 100 mL tampon hazırlanmış ve jel 30 dakika bu tampon içerisinde bekletilmiştir. 30 dakikanın ardından jeller Coomassie G 250 mavi boya ile 4 saat boyunca boyanmış, ardından deiyonize su ile boyadan arındırılmıştır. Boyanın jelden tamamen uzaklaşması ve bantların belirginleşmesi için jel %5 Metanol, %7,5 Asetik asit ve %87,5 dH₂O su içeren 100 mL tamponda gece boyunca bekletilmiştir. Jel üzerinde moleküler ağırlık değişimlerine bakılarak enkapsülasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği belirlenmiştir.

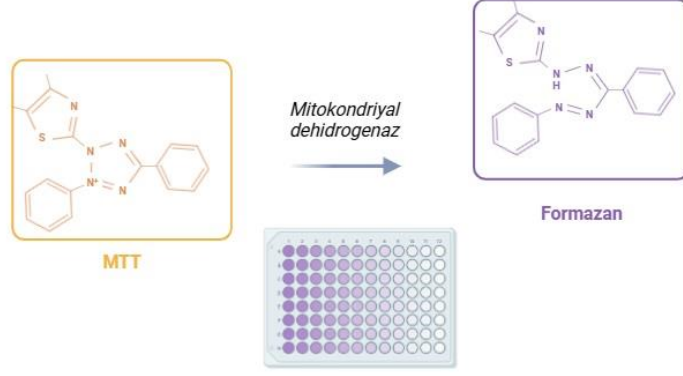
3.6. Apigeninin Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

Sitotoksite deneylerinde her bir apigenin dozu için 5 kuyucuk (n=5) hazırlanmıştır.

3.6.1. MTT Yöntemi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Apigeninin hücre canlılığı üzerindeki etkisi, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. MTT, sarı renkli bir formazan tuzudur ve hücrenin mitokondriyal aktivitesi mitokondriyal dehidrogenaz sayesinde mor renkli formazan tuzlarına indirgenir.

Bu aşamada, %95 Dimetil Sülfoksit (DMSO) ve %5 Amonyak çözeltisi kullanılarak mor rengi ortaya çıkması sağlanır. Spektral ölçümler sonucunda hücrelerin yüzde canlılık oranları belirlenir.



Şekil. 3.1 MTT testi çalışma prensibi, BioRender ile oluşturulmuştur.

Deneyimizde, keratinositler için öldürücü olmayan enkapsüle edilmiş ve edilmemiş apigenin dozunu belirleyebilmek için aşağıda belirtilen şekilde zaman ve doz-cevab deneyleri gerçekleştirilmiştir.

2 mg/ml apigenin içeren koşulda gerçekleştirilen enkapsülasyon sonucunda enkapsülasyon verimliliği %97 bulunmuştur. Bu doz için yapılan konsantrasyon hesaplaması sonucunda başlangıç için kullanılan 2 mg/ml apigeninin 7,4 μmol konsantrasyonda olduğu belirlenmiştir. Enkapsülasyon verimliliğine göre, enkapsülasyon sonucunda bu değer 7,1 μmol olarak düzeltilmiştir. MTT deneylerinde kullanılan dozlar bu değer esas alınarak hesaplanmıştır. 2 mg/ml Apigenin (7,1 μmol) 1:20 oranında seyreltildikten sonra aşağıda tabloda belirtilen miktarlar alınarak 50 μM , 40 μM , 30 μM , 20 μM ve 10 μM dozlarda uygulanmıştır.

Çizelge 3.1. MTT ve LDH deneylerinde kullanılan enkapsüle apigenin dozlarının hesaplanması

Enkapsüle Apigenin Dozu	Apigenin miktarı (µl)	Besiyeri miktarı (µl)
50 µM	57,14	942,86
40 µM	45,71	954,29
30 µM	34,28	965,72
20 µM	22,85	977,15
10 µM	11,42	988,58

Enkapsüle apigenin dozları uygulamasında 1:20 oranında seyreltilmiş olan apigeninden alınarak 1000 µl'ye besiyeri ile tamamlanmıştır.

Çizelge 3.2. MTT ve LDH deneylerinde kullanılan enkapsüle olmayan apigenin dozlarının hazırlanması

Enkapsüle Olmayan Apigenin Dozu	Stok Apigenin miktarı (µl)
50 µM	1,35
40 µM	1,08
30 µM	0,8
20 µM	0,55
10 µM	0,27

Enkapsüle olmayan apigenin dozları uygulanan kuyucuklar için 10 mg/ml konsantrasyonda stok apigenin (Sigma Aldrich) alınarak dozlar 1000 µl'ye besiyeri ile tamamlanmıştır.

1-HaCaT hücreleri 96 kuyulu plakalara (5×10^3) ekildikten sonra 24 saat kültüre edilmiştir.

2- Süre sonunda hücrelerin üzerine yukarıda belirtilen şekilde hazırlanan dozları içeren besiyerlerinden her bir kuyucuk için 200µl ilave edilmiş ve plakalar 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilmiştir.

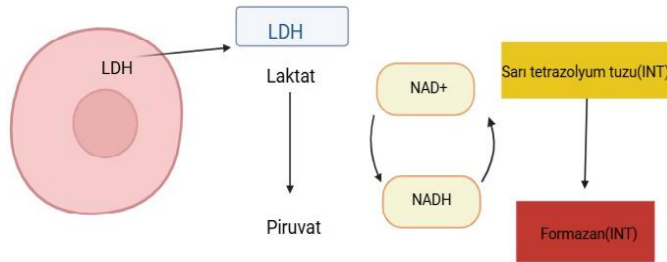
3- Ardından her kuyuya 10 µl 5 mg/ml MTT çözeltisi ilave edilerek 2 saat inkübe edilmiştir.

4-Süre sonunda besiyeri tamamen uzaklaştırıldıktan sonra her kuyucuğa 100 µl DMSO ilave edilmiştir ve gelişen formazan kristallerini çözmek için kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır.

5-Absorbans değerleri 550 nm'de Mikroplaka Okuyucu kullanılarak ölçülmüştür.

3.6.2. LDH testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Sitotoksiteyi ölçmek için sıklıkla yararlanılan bir yöntemdir. LDH, normal şartlar altında tüm hücrelerde bulunan bir enzimdir. Hücre plazma membranında meydana gelen hasar sonucunda hızla salınır. LDH, laktatın piruvata dehidrogenazını katalize ederek NAD^+ molekülünü NADH'ye indirger. Sarı tetrazolyum tuzunu indirgeyerek suda çözünen kırmızı formazon boyasını oluşturur. Ölü hücre sayısının ölçümü için formazon miktarı tayin edilir [41].



Şekil.3.2. LDH sitotoksite testi çalışma prensibi, BioRender ile oluşturulmuştur.

1-96 kuyucuklu plakalara 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Ayrıca spontan LDH Aktivite Kontrolleri (su) ve Maksimum LDH Aktivite Kontrolleri (10X Lizis Tamponu) için kuyucuk kullanılmıştır. HaCaT hücreleri 96 kuyulu plakalara (5×10^3) ekildikten sonra 24 saat kültüre edilmiştir.

2- Plaka gece boyunca $37^\circ C$, %5 CO_2 ' de inkübe edildikten sonra MTT deneyi ile aynı şekilde hazırlanan apigenin dozlarını içeren besi yerleri 200µl/ kuyucuk olacak şekilde

hücrelerin üzerine ilave edilmiş ve plaklar 24 ve 48 saat süre ile 37°C’de inkübe edilmiştir.

3- İnkübasyon sonunda her bir kuyucuktan 50 µl besiyeri yeni bir 96 kuyucuklu plakaya aktarıldıktan sonra üzerine kit içerisinde bulunan reaksiyon karışımından 50 µl eklenmiştir.

4-Plaka ışıktan korunarak 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

5- Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenilerek reaksiyon durdurulmuş ve plaka okuyucu kullanarak 490 -680 nm’de absorbans ölçülmüştür.

% Sitotoksosite değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

% Sitotoksite = (Bileşik kaynaklı LDH aktivitesi- Spontan LDH aktivitesi ÷ Maksimum LDH aktivitesi- Spontan LDH aktivitesi) × 100

3.7. Hücrelerin Apigenin ile Uyarılması

%10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş yüksek glikozlu DMEM (Sigma Aldrich) içerisinde yukarıda belirtildiği şekilde farklılaştırılmış ve atopik dermatit modeli oluşturulmuş HaCaT (keratinosit) hücreleri 24 saat süre ile belirlenen enkapsüle edilmiş ve edilmemiş apigenin ile kültüre edilmiştir. HaCaT hücreleri, in vitro AD özelliklerini taklit etmek amacıyla 10 ng/ ml IL-13, 10 ng/ ml IL-4 ve 30 ng/ ml TNF- α ile uyarılmıştır. Süre sonunda hücre kültür medyaları toplanarak ELISA deneylerinde kullanılmak üzere -80 °C'de saklanmıştır.

Koşullar

- 1- Farklılaştırılmış Keratinosit hücreleri
- 2- Farklılaştırılmış Keratinosit hücreleri AD modeli
- 3- Enkapsüle edilmemiş Apigenin (belirlenen 1. Doz)
- 4- Enkapsüle edilmiş Apigenin (belirlenen 1. Doz)
- 5- Enkapsüle edilmemiş Apigenin (belirlenen 2. Doz)
- 6- Enkapsüle edilmiş Apigenin (belirlenen 2. Doz)

Her bir koşul için 5 tekrar yapılmıştır.

3.8. İn Vitro Çizik Testi /Migrasyon Testi

Atopik dermatitte kaşıntı sonucu oluşan yaraların iyileşmesi üzerine apigeninin etkisini belirlemek için in vitro yara modeli olarak çizik testi yapılmıştır. Çizik testi için HaCaT hücreleri 12 kuyucuklu kültür plağında her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde 1ml %10 FBS ve %1 Penisilin Streptomisin içeren yüksek glikozlu DMEM içerisinde ekilmiş ve hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Hücreler kuyucukları tamamen kapladığında çizik testi yapılmıştır. Çizik migrasyon testi plakaları AD model plakası ve AD modeli olmayan plaka olarak ikiye ayrılmıştır. AD model plakası için HaCaT hücreleri, in vitro AD özelliklerini taklit etmek amacıyla 10 ng/ ml IL-13, 10 ng/ ml IL-4 ve 30 ng/ ml TNF- α ile uyarılmıştır. AD olmayan plakada ise HaCaT hücreleri uyarılmamıştır.

Kuyucuklarda %100 konfluent olan hücreler steril bir 200 µL'lik pipet ucu yardımı ile kuyucuk ortasında çizik oluşturulmuştur (0.saat).

Müdahale nedeni ile oluşan veya oluşabilecek atıklar iki kere PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve üzerine belirtilen dozlarda apigenin içeren besiyeri eklenmiştir. Yara iyileşme modelinde hücreler MTT ve LDH deneyleri sonucunda 20 µM ve 40 µM olarak belirlenen dozlarda apigenin ve nanoenkapsüle apigenin kompleksi ile muamele edilmiştir. Yara iyileşmesinin gözlenebilmesi için kuyucuklardan 0, 24 ve 48. saatlerde dijital kameraya bağlı ışık mikroskobu ile görüntü alınmıştır. Kuyucuk başına 3 görüntü alınarak yara alanı Image J programı kullanılarak belirlenmiştir.

Yara İyileşmesi (%): $T_0 - T_x / T_0 \times 100$ formülü ile hesaplanmıştır.

T₀: Çizik oluşturulan ilk zamandaki yara alanı (0.saat)

T_x: Kaydedilen zamandaki yara alanı

Kontrol örneğinin alanı ile kıyaslanarak kapanma oranı % olarak verilmiştir ve ışık mikroskobundan elde edilen görüntüler kıyaslanmıştır.

3.9. İnflamatuvar Sitokin Seviyelerinin Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR) ile Gösterilmesi

Yukarıda yer alan 3.7'de açıklanan koşullar kullanılarak hazırlanan örneklerden 3.2.1 'de yer alan RNA izolasyon yöntemi ile RNA izole edilmiştir (n=3). Ardından, izole edilen RNA örneklerinden 3.2.2 de belirtildiği şekilde cDNA örnekleri hazırlanmış ve aşağıda belirtilen primerler kullanılarak 3.2.3' de belirtildiği koşullarda SYBR Green yöntemi aracılığı ile literatürde atopik dermatitle ilişkisi gösterilmiş olan IL-1β, TSLP ve IL-6 genlerinin ifadelerindeki değişim belirlenmiştir.

IL-6

Direkt primer 5'-GCAGATGAGTACAAAAGTCCTGA-3'

Ters primer 5'-TTCTGTGCCTGCAGCTTC-3'

IL-1β

Direkt primer 5'-TTGAAGCTGATGGCCCTAAA-3'

Ters primer 5'-TGAACCCCTTGCTGTAGTG-3'

TSLP

Direkt primer 5'-CCAGAGCCTAACCTTCAATCC-3'

Ters primer 5'- CCTCTTCTTCATTGCCTGAGTAG-3'

3.10. ELISA ile İnflamatuvar Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

Apigenin uygulaması sonucu insan keratinosit hücrelerinden salınan ve atopik dermatit patolojisinde etkili olan TSLP, IL-22 ve IL-6 miktarındaki değişimlerin tayin edilmesinde ELISA yöntemi kullanılmıştır. ELISA yöntemi kitin temin edildiği firmanın prosedürü doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Özet prosedür aşağıda yer almaktadır.

1. Yakalayıcı antikor ile kaplı plakalarda yer alan kuyucuklara örnekler ve standartlar belirtilen miktarda eklenir ve kit içerisinde belirlenen süre ile 37°C'de inkübe edilir.
2. Beklenen sürenin ardından yıkama yapılmadan solüsyonlar kuyucuklardan uzaklaştırılır.
3. Enzim aralı konjuge antikor ilave edilir ve belirtilen süre 37°C'de inkübe edilir.
4. Yıkama solüsyonu aracılığı ile yıkama adımı 3 kez tekrarlanacak şekilde bağlanmayanlar uzaklaştırılır.
5. Kitin içeriğinde bulunan enzime özgü olan substrat ilave edilir ve belirtilen süre inkübe 37°C'de inkübe edilir. Plaka ışıktan korunur.
6. Durdurma solüsyonu kullanılarak reaksiyonun durdurulması sağlanır ve 450 nm'de kolorimetrik mikro plaka okuyucu ile her kuyucuğun optik yoğunluğu belirlenir.
7. Mikro plaka okuyucudan elde edilen standart grafikten yararlanılarak örneklerin konsantrasyonları belirlenir.

3.11. İstatistiksel Analizler

Veriler, en az üç bağımsız deneyden elde edilen ortalama \pm standart sapma olarak rapor edilmiştir.

Sonuçların istatistiksel değerlendirmesi Windows için SPSS programı kullanılarak yapılmıştır. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ikiden fazla grup karşılaştırması için Kruskal Wallis H, iki grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Gerçek Zamanlı PZR sonuçları ise $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi belirlenmiş, sonuçlar kat artış şeklinde verilmiştir. Tüm analizlerde *p*-değerinin 0.05'ten az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

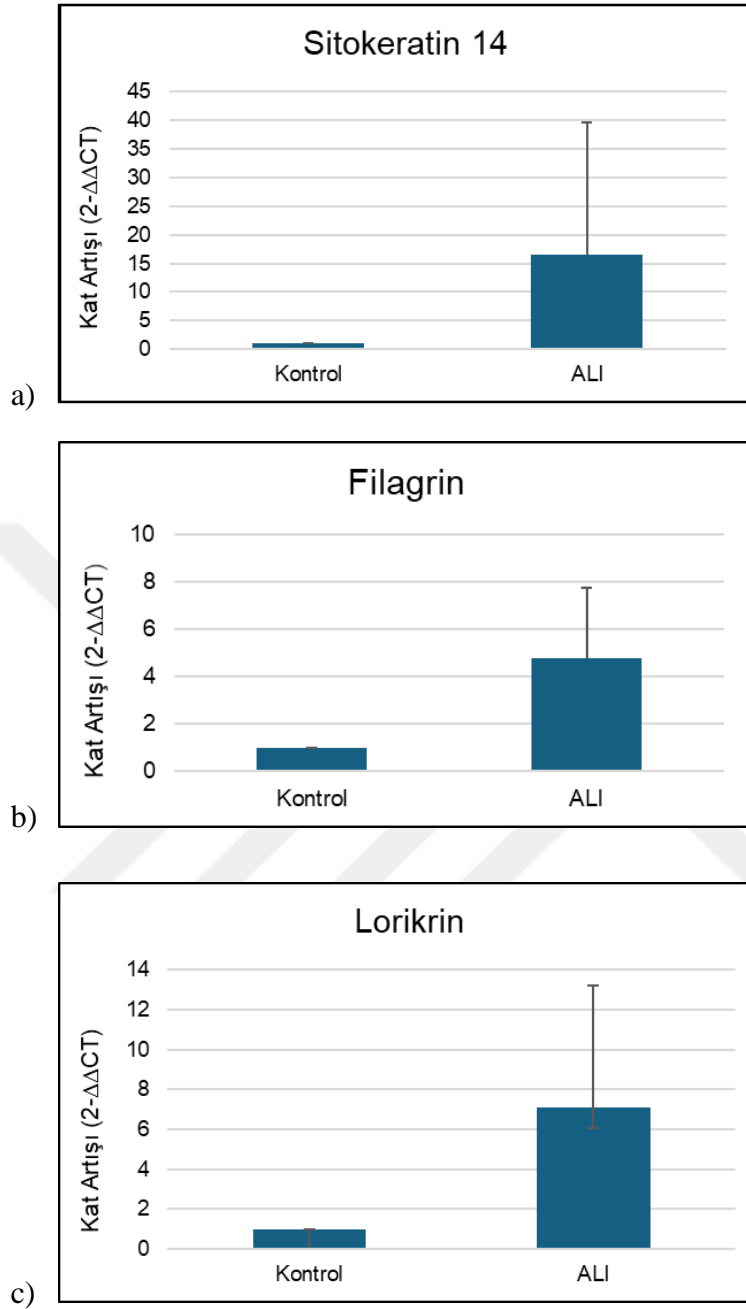
Bu tez çalışmasında, apigenin flavonoidinin insan keratinosit hücreleri kullanılarak oluşturulan AD modeli üzerindeki potansiyel biyoaktif etkisi değerlendirilmiştir. Atopik dermatit modeli oluşturulmuş HaCaT hücrelerinde (insan epidermal keratinosit) apigenin flavonoidinin anti-inflamatuar etkilerinin ve yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Gerçekleştirilen tez kapsamında, apigenin flavonoidinin anti-inflamatuar etkilerini değerlendirmek için yeniden yapılandırılmış insan epidermis (reconstructed human epidermis, RHE) modeli kullanılmıştır. 3 boyutlu hücre kültür modeli olan bu modelde verimli bir epidermal bariyerin üretimini sağlamak için, keratinositlerin tabakalaşmalarını destekleyen hava-sıvı ara yüzü (Air Liquid Interface) koşullarında keratinositler kültüre edilmiştir. HaCaT hücreleri, in vitro AD özelliklerini taklit etmek için interlökin (IL)-4, IL-13 ve TNF- α ile uyarılmıştır. Ardından apigenin flavonoidinin inflamasyon ve yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için belirlenen dozlarda ve sürede apigenin ile uyarılmıştır. Elde edilen hücre kültür süpernatantlarında atopik dermatitte etkisi olduğu bilinen sitokinler olan TSLP, IL-22 ve IL-6 sitokinlerin seviyelerindeki değişiklikler ELISA ile belirlenmiştir. AD'nin en önemli semptomlarından olan kaşıntı sonucu oluşan cilt yaralarının iyileşmesi üzerine olan etkileri de yara iyileşme modeli ile değerlendirilmiştir.

4.1 İnsan Keratinosit Hücrelerinden Atopik Dermatit Modeli Oluşturulması: Keratinosit Hücrelerin Farklılaşmasının Gerçek Zamanlı PZR (Real Time PCR) ile Gösterilmesi

14 gün süreyle Air Liquid Interface (ALI) kültür modeli kullanılarak günaşırı besleyerek farklılaştırılan hücreler atopik dermatit modeli oluşturmak için IL-4 ve IL-13 ve TNF- α ile uyarılmış, ardından RNA izolasyonu ve cDNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Keratinosit farklılaşması için önemli genler olan sitokeratin 14, lorikrin ve fillagrin genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için SYBR green yöntemi kullanılarak Gerçek zamanlı PZR deneyleri gerçekleştirilmiştir.

Gerçek Zamanlı PZR deneyi sonucunda elde edilen sonuçlar Şekil 4.1’de sunulmuştur.



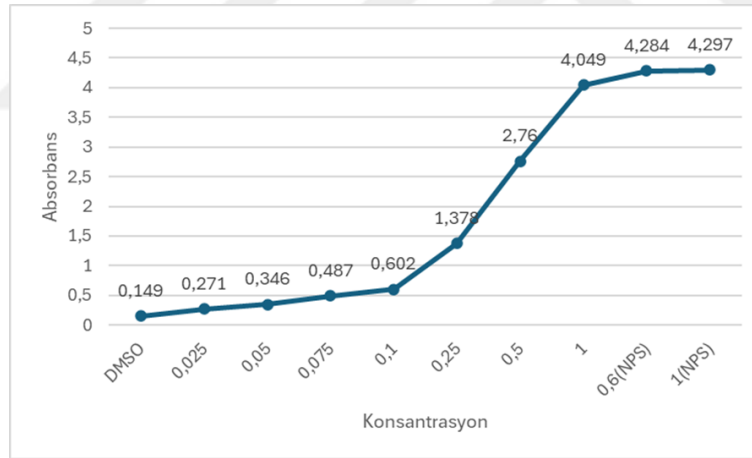
Şekil 4.1. Keratinofit farklılaşmasının gen ifadesindeki değişiklikler ile gösterilmesi. a) Sitokeratin 14, b) Filagrin, c) Lorikrin

Gerçek Zamanlı PZR sonuçları analiz edilirken kontrol kuyucuğu ve ALI kuyucuklarından elde edilen ve PZR’ de kullanılan RNA örneklerin miktar açısından normalizasyonu için “housekeeping” gen olarak bilinen EF-1 α geni kullanılmıştır. Keratinosit farklılaşması için önemli genler olan sitokeratin 14, lorikrin ve fillagrin genlerinin ifade düzeylerindeki değişim 2^{-ΔΔCt} değeri hesaplanarak belirlenmiştir. İfade

seviyeleri kontrol kuyucuğundaki gen ifadeleri ile karşılaştırılarak kat artışı şeklinde hesaplanmıştır. Farklılaştırmanın başarılı olarak kabul edilebilmesi için tüm kuyucuklarda seçilen bu üç genden en az ikisinin ifadelerinde kontrollere kıyasla artışın gözlemlenmiş olması beklenmektedir. Yapılan analizler sonucunda, hava-sıvı ara yüzü oluşturulan ALI kuyucuklarının her birinde hücre farklılaşması görülmüştür. Elde edilen sonuçlar ışığında, seçilen sitokeratin 14, lorikrin ve fillagrin genlerinde hava-sıvı ara yüzü modeli oluşturulan tüm örnekler kontrol kuyucuğundakine kıyasla artış gözlemlenmiştir.

4.2 Apigeninin Peynir Altı Suyu (Whey) Proteini İzolatı ile Nanoenkapsülasyonu Sonrasında Kapsülleme verimliliği (EE) ve yükleme kapasitesi (LC)'nin Belirlenmesi

Miktar tayininde standart grafik hazırlamak için DMSO içinde çözülmüş apigenin içeren standart çözeltilerden elde edilen absorbans değerleri kullanılmıştır. Standart grafik hazırlanması için dozlar; 0,025 mg/ml, 0,050 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml ve 1 mg/ml olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Miktar tayini için belirli dozlarla hazırlanan standart grafik

Kapsülleme verimliliği (EE) ve yükleme kapasitesi (LC) daha sonra aşağıdaki denklemlere göre belirlenmiştir.

$$\%EE = \frac{\text{Toplam apigenin (mg)} - \text{enkapsüle edilmemiş apigenin (mg)}}{\text{toplam apigenin(mg)}} * 100$$

$$LC = \frac{\text{Toplam apigenin (mg)} - \text{enkapsüle edilmemiş apigenin (mg)}}{\text{toplam peynir altı suyu (g)}}$$

0,6 mg/mL dozu için yapılan hesaplama sonucunda; kapsülleme verimliliği %66 olarak hesaplanmıştır. Yükleme kapasitesi ise 41,4 bulunmuştur.

1 mg/mL dozu için yapılan hesaplama sonucunda ise; kapsülleme verimliliği %61,7 olarak hesaplanmıştır. Yükleme kapasitesi ise 61,7 bulunmuştur.

Kapsülleme verimliliği ve yükleme kapasitesi literatürdeki yayınlara kıyasla düşük bulunmuştur. Bu nedenle ikinci deneme olarak Peynir altı suyu izolatu (WPI) 5 mg/mL olacak şekilde 4 °C' de gece boyunca deiyonize su içerisinde hidratlandıktan sonra 5,0 mg/mL WPI solüsyonuna 1,0 ve 2,0 mg/mL apigenin ilave edilmiştir ve pH döngüsü yöntemine göre enkapsüle edilmiştir.

1 mg/mL dozu için yapılan hesaplama sonucunda; kapsülleme verimliliği %72,4 olarak hesaplanmıştır. Yükleme kapasitesi ise 90,2 bulunmuştur.

2 mg /mL dozu için yapılan hesaplama sonucunda; kapsülleme verimliliği %97,65 olarak hesaplanmıştır. Yükleme kapasitesi ise 390 bulunmuştur. Literatürde yer alan yayınlar ile kıyaslandığında kapsülleme verimliliği %97,65 ile ideal olarak 2 mg/ml dozu deneylerde kullanılmak üzere uygun bulunmuştur.

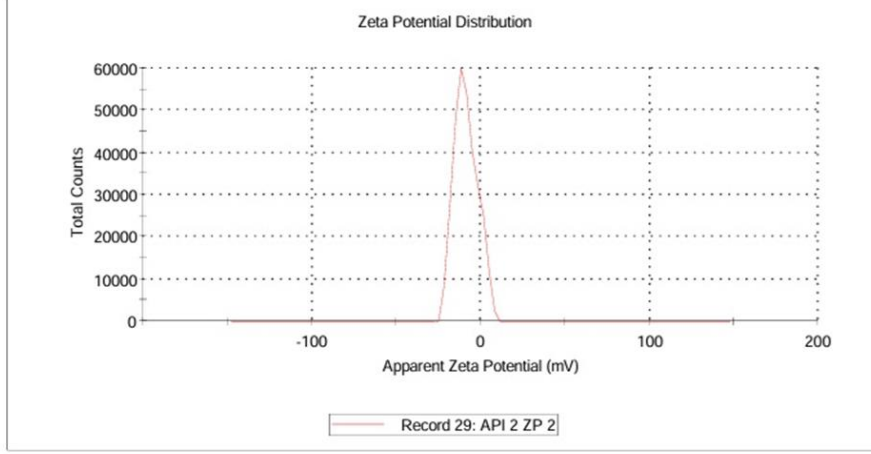
4.3 Nanoenkapsüle Apigeninin Karakterizasyonu

4.3.1. Parçacık boyutu ve zeta potansiyeli ölçümleri

pH 7.0 dispersiyonlarının parçacık boyutu dağılımlarını belirlemek için dinamik ışık saçılımı (DLS) kullanılmıştır. Hem parçacık boyutu hem de zeta potansiyeli ölçümleri, bir Zetasizer Nano-ZS serisi cihazla gerçekleştirilmiştir.

Results

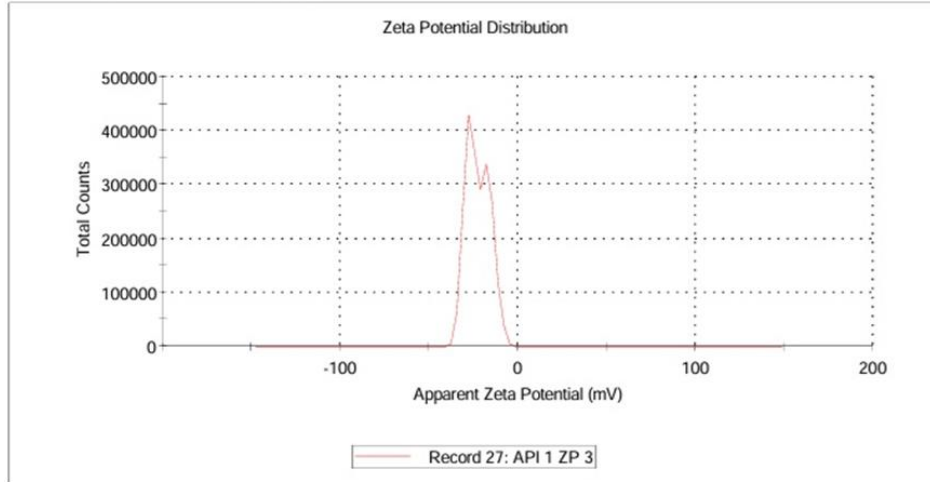
	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -8.51	Peak 1: -8.51	100.0	6.75
Zeta Deviation (mV): 6.75	Peak 2: 0.00	0.0	0.00
Conductivity (mS/cm): 0.0742	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			



a)

Results

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -22.3	Peak 1: -26.3	57.0	3.85
Zeta Deviation (mV): 6.57	Peak 2: -16.5	43.0	3.78
Conductivity (mS/cm): 0.170	Peak 3: 0.00	0.0	0.00
Result quality : Good			

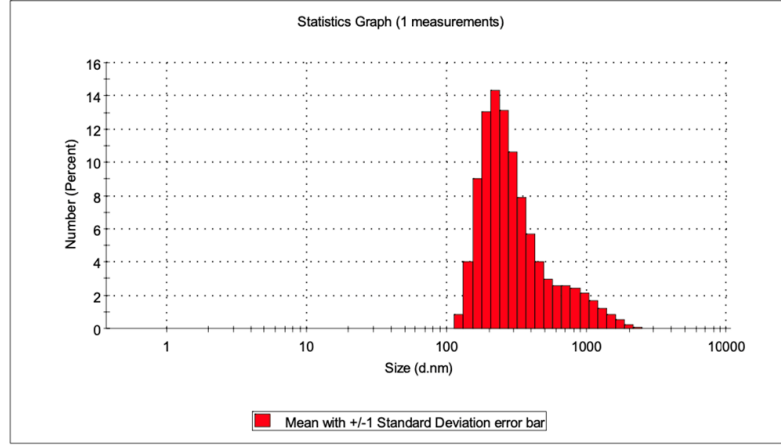


b)

Şekil 4.3. a) 2 mg/ml ve b) 1 mg/ml enkapsüle API nanopartiküllerine ait (pH 7.4'te) zeta potansiyel grafikleri.

ÖRNEK	ORTALAMA BOYUT (nm)	ORTALAMA ZETA POTANSİYEL (mV)
1mg/mL API	520,7887	-22,8166667
2mg/mL API	511,453705	-9,32

Çizelge 4.1. 1mg/ml ve 2mg/ml enkapsüle API nanopartiküllerine ait 5 ölçümün sonucunda elde edilmiş ortalama boyut (nm) ve ortalama zeta potansiyel (mV)



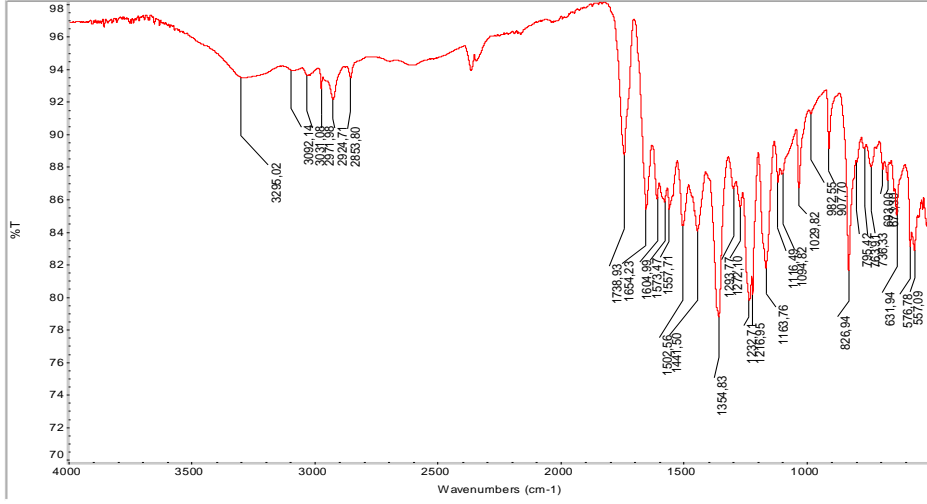
Şekil 4.4. 2mg/mL enkapsüle API nanopartiküllerine ait 5 ölçümün sonucunda elde edilmiş ortalama boyut (nm) grafiği

Ortalama partikül boyutu referans alınan makaleye uygun bir şekilde 500 nm civarındadır. Zeta potansiyel ise beklendiği gibi eksi değerdedir. Bu durum nanopartikül örneklerinin yüksek stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir.

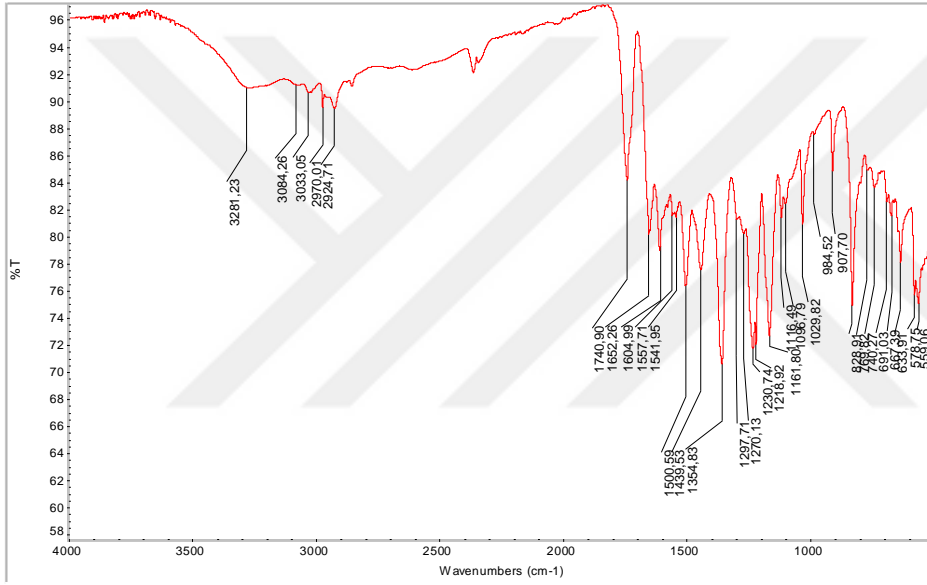
4.3.2. Fourier dönüşümü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi

Elde edilen örnekler olan, 2 mg/ml enkapsüle apigenin ve PBS içerisinde çözülen peynir altı suyu izolatının yapısal karakterizasyonu FT-IR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Ürünlere ait FT-IR spektrumları Şekil 4.5.a ve 4.5.b’de sunulmuştur.

Dondurularak kurutulmuş örnekler, FT-IR spektrometresinin ZnSe kristali ile donatılmış düz üst plakasına doğrudan yerleştirilmiş ve her numunenin 64 taramasından 400–6000 nm arasında tarama yapılmıştır.



a)



b)

Şekil 4.5. a) PBS içerisinde çözülen peynir altı suyu izolatının FT-IR spektrumları b) 2 mg/ml enkapsüle apigenin FT-IR spektrumları

Örneklere ait FT-IR spektrumları incelendiğinde, 3295-2850 cm^{-1} arasında değişen pikler -OH gerilme titreşimlerini ifade etmektedir, bu durum yapıdaki su varlığından kaynaklanır.

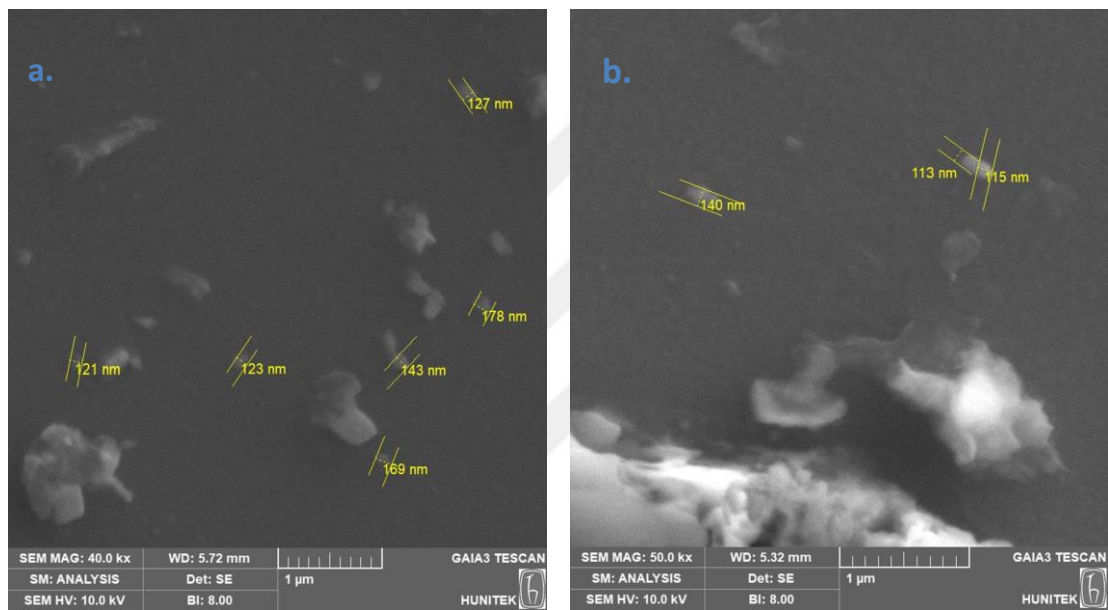
İşlenmemiş peynir altı suyu proteininin 1502,50 cm^{-1} 'deki emilim zirvesi, pH döngüsü işleminden ve kapsüllemeden sonra 1500,59 cm^{-1} 'e kaymıştır; bu, apigenin ve peynir altı suyu proteinleri arasındaki fiziksel bağlanmayı ve hidrofobik etkileşimi göstermektedir. Amid 2 bantları, proteinlerin ikincil yapısı ile ilgili özellikleri yansıtan bantlardır. Kapsülleme öncesi ve sonrasında emilim zirvesinde meydana gelen kayma hidrofobik

etkileşimlerin meydana geldiğini ve apigeninin peynir altı suyu proteinine non-kovalent şekilde bağlandığını göstermektedir [32].

Tüm bu sonuçlar ışığında enkapsüle apigeninin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu söyleyebiliriz.

4.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Hazırlanmış 1 mg/ml ve 2 mg/ml konsantrasyonlarda enkapsüle edilmiş apigenin örneklerinin boyut ve şekilleri SEM ile incelenmiştir. SEM örneklerinin görüntüleri Şekil 4.6a ve 4.6b’de sunulmuştur.

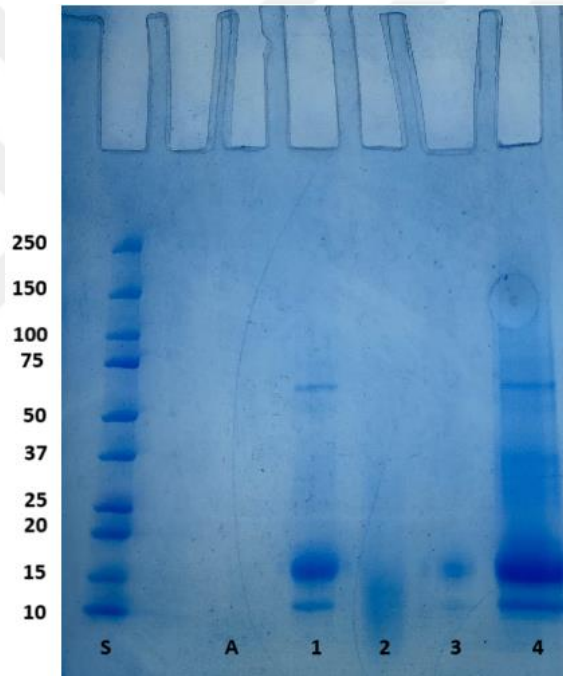


Şekil 4.6. a) 5,0 mg/mL WPI'de 1,0 mg/mL API ile hazırlanan nanodispersiyonun SEM görüntüsü b) 5,0 mg/mL WPI'de 2,0 mg/mL API ile hazırlanan nanodispersiyonun SEM görüntüsü

Her iki konsantrasyonda hazırlanan dispersiyonların SEM görüntüleri incelendiğinde yapısal olarak düzgün kenarlı, yuvarlak şekilli nanopartiküller bulunmuştur. Ancak nanopartiküllerin eşit bir şekilde dağılmadığı, agregasyona rastlanan görüntüler de bulunmaktadır. Bunun nedeninin, pH döngüsü deneyinin ardından oluşan yoğun peletin besiyeri içerisinde yeteri kadar çözülmeden görüntülerin çekilmesi kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

4.4. Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

5 mg/mL WPI içeren dispersiyonların pH döngüsü işleminden önce ve 2 mg/mL apigenin ile kapsüllemeden sonra moleküler ağırlık değişikliklerini analiz etmek için SDS-PAGE kullanılmıştır. Apigenin peynir altı suyu proteini izolatı ile nanoenkapsülasyonunun sağlandığı pH döngüsü yöntemi sırasında meydana gelen her pH değişiminde SDS-PAGE deneyinde kullanılması amacı ile örnek alınmıştır. Alınan örnekler pH döngüsü işleminden önce, pH=13'te alınan örnek, pH=10'da alınan örnek ve pH döngüsü işleminden sonra pH= 7'de alınan örnek olarak sıralanmıştır. Ayrıca peynir altı suyu proteini ile enkapsüllemeden önce protein varlığı bulunmayan stok Apigenin de kontrol olması amacı ile kuyucuğa yüklenmiştir.



Şekil 4.7. Dispersiyonların moleküler ağırlıklarının SDS-PAGE deneyi ile tespiti

S; Moleküler Ağırlık Standartı 250-10 kDa, A; stok Apigenin, 1; pH döngüsü öncesi dispersiyon, 2; pH:13 dispersiyonu, 3; pH:10 dispersiyonu ve 4; pH 7'deki dispersiyon (pH döngüsünün sonu)

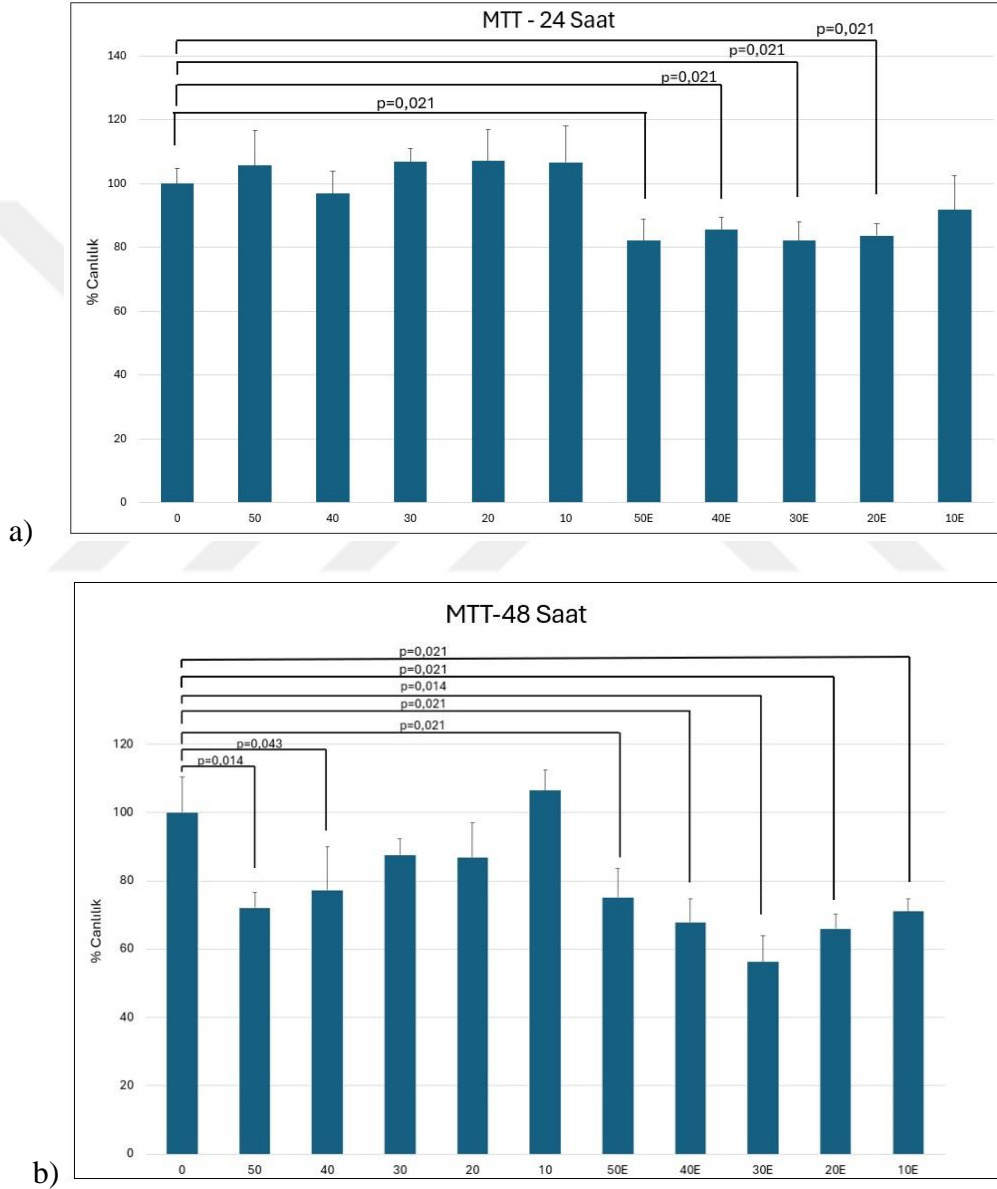
SDS-PAGE deneyinde yüklenen tüm pH koşullarında örnekler yaklaşık olarak 15 kDa civarında bant vermiştir. Bu durum bize protein bileşenlerinin moleküler ağırlık açısından sabit kalarak büyük oranda değişmediğini göstermektedir.

Apigenin bir flavonoid olduğu için protein içermemektedir. Stok apigenin yüklenen kuyucukta beklenen şekilde bant oluşmamıştır.

4.5. Apigeninin Sitotoksitenin Değerlendirilmesi

4.5.1. MTT Yöntemi ile Hücre canlılığının Belirlenmesi

Hücre canlılık analizi (MTT) sonuçları Şekil 4.7 'de sunulmuştur.



Şekil 4.8. Hücre canlılık analizi (MTT) sonuçları a) 24. Saat, b) 48. Saat

24 saat süreyle enkapsüle ve enkapsüle edilmemiş olan apigeninin (serbest) farklı dozları ile uyarılan hücrelerin MTT analiz sonuçlarının istatistiksel analizleri neticesinde tüm örneklerin dahil edildiği Kruskal Wallis H analizinde p değeri $<0,001$ bulunmuştur.

Kontrol ile kıyaslandığında enkapsüle edilmemiş apigenin dozlarından 50, 40, 20 ve 10 dozları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 30 dozunda p değeri 0,043 bulunmuştur. Grafikte de görüldüğü üzere enkapsüle edilmemiş apigeninin 24 saat süre sonunda hücre canlılığı üzerine olumsuz bir etkisi tespit edilmemiştir. Enkapsüle apigenin dozlarında 50E, 40E, 30E ve 20E, dozlarında $p=0,021$ bulunmuştur, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmektedir.

Serbest apigenin ve enkapsüle apigeninin aynı dozları birbirleri ile kıyaslandığında 10-10E dozları dışında hepsi istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,050$) bulunmuştur. 10 ve 10E dozlarının p değeri 0,083 bulunmuştur.

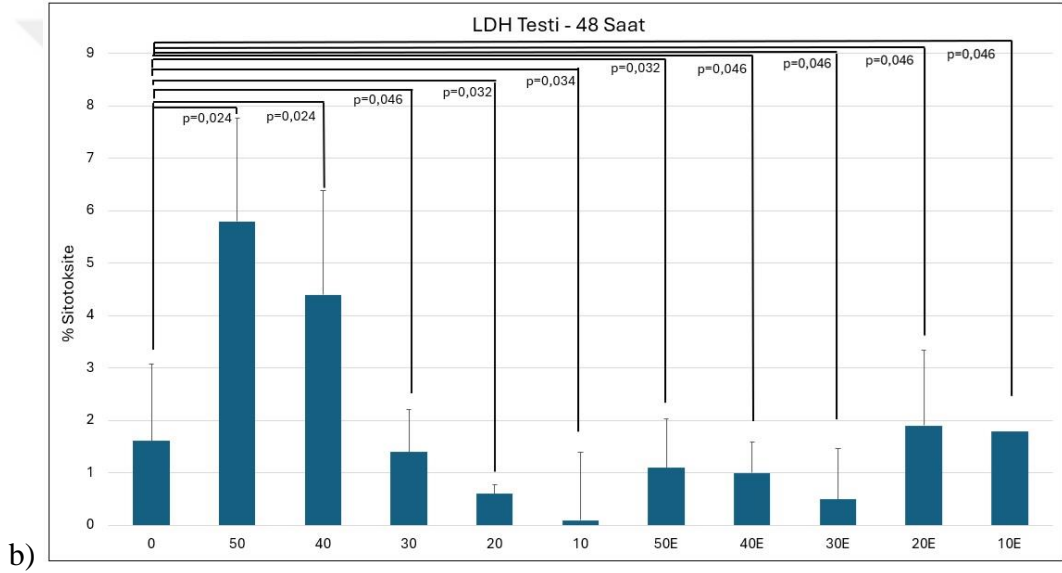
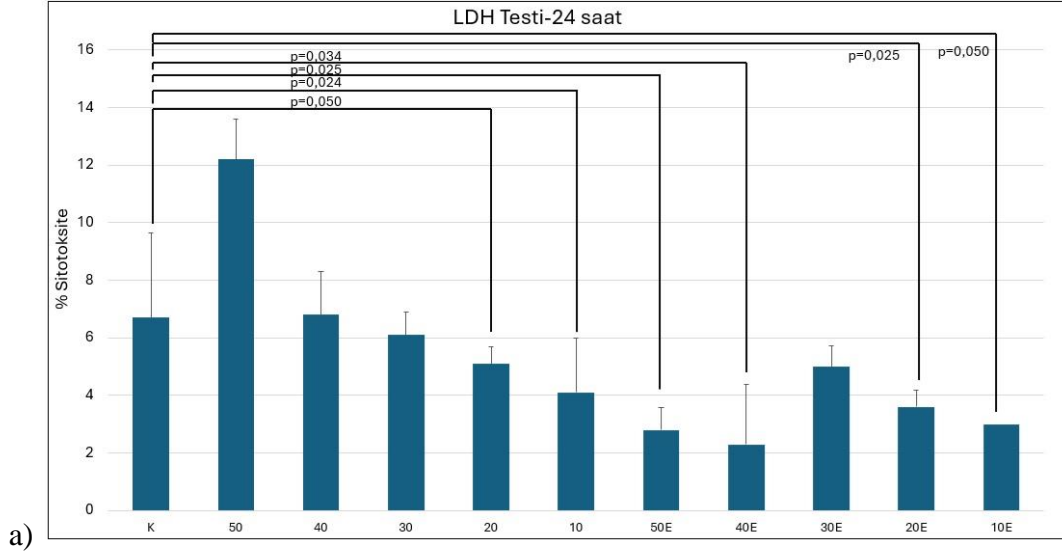
Hücrelerin belirlenen enkapsüle edilmemiş ve edilmiş olan apigenin dozları ile 48 saat inkübasyon sonunda gerçekleştirilen MTT analizlerinin istatistiksel analizi sonucunda, tüm örneklerin dahil edildiği Kruskal Wallis H analizinde p değeri $<0,001$ olarak bulunmuştur. İkili grupların kıyaslandığı Mann-Whitney U testinde kontrolle kıyaslanan tüm dozlar içerisinde 30, 20, 10 μM enkapsüle edilmemiş apigenin dozlarının hücre canlılığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Test edilen tüm diğer dozların ise kontrol örneği ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olarak ($p <0,050$) hücre canlılığını azalttığı belirlenmiştir.

Serbest apigenin ve enkapsüle apigeninin aynı dozları birbirleri ile kıyaslandığında 50 μM ve 40 μM dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir. Serbest ve enkapsüle apigeninin 30 μM , 20 μM ve 10 μM dozlarının hücre canlılığı üzerine etkileri kıyaslandığında aynı dozlar arasında 48 saat sonunda istatistiksel olarak anlamlı ($p <0,05$) fark bulunmuştur.

4.5.2. LDH testi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

Keratinositler için öldürücü olmayan enkapsüle edilmiş ve edilmemiş apigenin dozunu belirleyebilmek için metot kısmında belirtilen şekilde zaman ve doz-cevap deneyleri gerçekleştirilmiştir. LDH sitotoksitesi aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

% Sitotoksite = (Bileşik işlenmiş LDH aktivitesi- Spontan LDH aktivitesi \div Maksimum LDH aktivitesi- Spontan LDH aktivitesi) \times 100



Şekil 4.9. a) 24 ve b) 48. Saatlerde elde edilen % Sitotoksité değerleri (LDH Testi Sonuçları)

Hücrelerin belirtilen dozlarda enkapsüle edilmiş ve edilmemiş apigenin ile 24 saat süre uyarılması sonrasında gerçekleştirilen LDH testi sonucunda elde edilen % sitotoksité değerlerine bakıldığında enkapsüle edilmemiş olan 50µM apigenin dozu haricinde diğer enkapsüle edilmiş ve edilmemiş apigenin dozlarından elde edilen sitotoksité değerlerinin kontrolden daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. 24 saat LDH Sitotoksité Testi verilerinin analizi sonucunda de tüm grupların bir arada değerlendirildiği Kruskal Wallis H. analizinde p değeri $<0,001$ olarak bulunmuştur. Gruplar kontrol grubu ile ikili olarak kıyaslandığı (Mann Whitney U) analiz sonucunda serbest apigenin grubundan 20,10

grupları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). 50, 40, 30 grupları kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. 20 μ M ve 10 μ M dozlarında tespit edilen anlamlılık ise kontrole kıyasla daha az sitotoksik bulunmasından kaynaklanmaktadır. Enkapsüle apigenin dozlarında kontrol grubuyla kıyaslandığında 50E, 40E, 20E ve 10E grupları istatistiksel olarak anlamlı ($p <0,05$) bulunmuştur. Aynı şekilde farkın nedeni enkapsüle apigenin dozlarının uyarılmamış olan kontrol grubuna kıyasla sitotoksosite değerlerinin daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır.

Serbest apigenin ve enkapsüle apigeninin aynı dozları birbirleri ile kıyaslandığında ise 30 μ M ve 10 μ M dozları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. 50 μ M, 40 μ M ve 20 μ M dozları ise istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$) bulunmuştur. 50 μ M, 40 μ M ve 20 μ M enkapsüle apigenin dozları aynı miktar enkapsüle edilmemiş apigenin dozlarına kıyasla daha az sitotoksik olarak belirlenmiştir.

Enkapsüle edilmiş ve edilmemiş apigenin ile 48 saat süre uyarılması sonrasında gerçekleştirilen LDH testi sonucunda elde edilen % sitotoksosite değerlerine bakıldığında enkapsüle edilmemiş olan 50 μ M ve 40 μ M apigenin dozu haricinde diğer enkapsüle edilmiş apigenin dozlarından elde edilen sitotoksosite değerlerinin kontrolden daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Enkapsüle edilmiş olan apigenin dozlarının % sitotoksosite değerleri kontrole kıyaslandığında ise tüm dozların kontrolden daha düşük veya kontrole yakın sitotoksosite değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. 48 saat sonrası LDH Sitotoksosite Testi sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizde tüm grupların bir arada değerlendirildiği Kruskal Wallis H. analizinde p değeri $<0,001$ bulunmuştur. Gruplar kontrol grubu ile ikili olarak kıyaslandığında ise tüm gruplar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Enkapsüle apigenin dozlarında kontrol grubuyla kıyaslandığında tüm dozlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p<0,05$)

Enkapsüle apigenin dozları ile enkapsüle olmayan apigenin dozları kıyaslandığında hem 24 saat hem de 48.saatlerde enkapsüle apigenin içeren dozların enkapsüle olmayanlara kıyasla daha az sitotoksik ve kontrole kıyasla ise 24 ve 48. saatte 50 μ M ve 48. saatte 40 μ M enkapsüle edilmemiş apigenin dozları hariç toksik olmadığı sonucuna varılmıştır. 24 saat sonunda ölçülen sonuçlara kıyasla 48.saatte ölçülen sonuçlarda sitotoksosite daha da düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında, enkapsüle apigenin dozlarının hücreye toksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır. LDH deneylerinden elde edilen sonuçlar

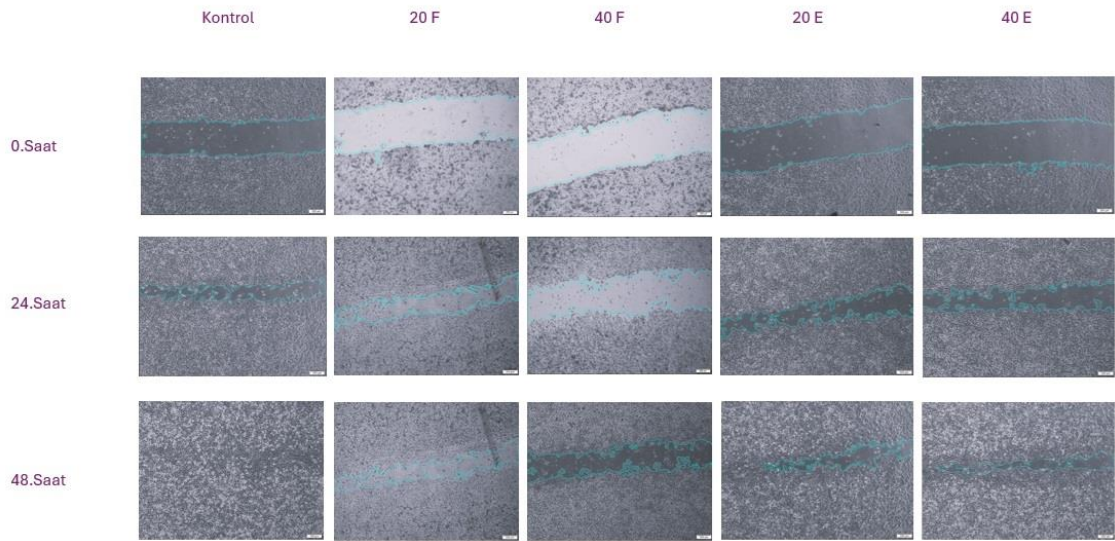
MTT deney sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde hücre kültürü deneyleri için uygun 20 µM (düşük doz) ve 40 µM (yüksek doz) olarak seçilmiştir.

4.6. İn Vitro Çizik Testi /Migrasyon Testi Sonuçları

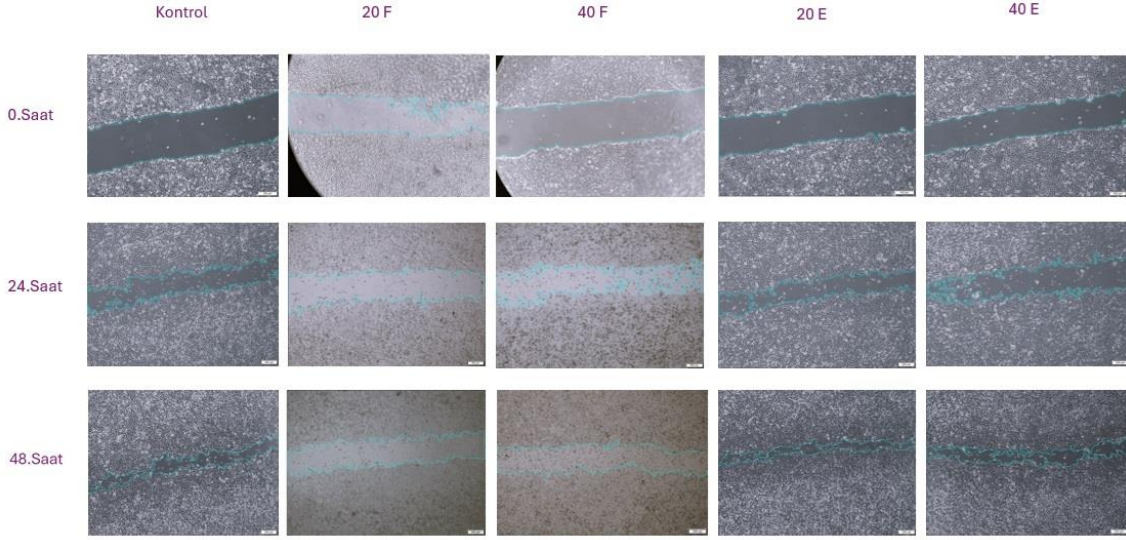
Atopik dermatitte kaşıntı sonucu oluşan yaraların iyileşmesi üzerine apigeninin etkisini belirlemek için in vitro yara modeli olarak çizik testi yapılmıştır.

0.günde kuyucuğun ortasında oluşturulan çizik modelinin 0. Saat, 24. Saat ve 48.saatlerde dijital kameraya bağlı ışık mikroskobu aracılığı ile görüntüleri alınmıştır. Her bir koşul için 3 kuyucuk hazırlanmış ve her kuyucuk için 3 görüntü alınmıştır ve yara alanı Image J programı üzerinden hesaplanmıştır. Sonuçlar her kuyucuk için; alınan 3 görüntünün ortalamasına göre hazırlanmıştır. Saatlere bağlı olarak hesaplanan % yara iyileşme formülü aşağıda verilmiştir.

$$\% \text{ Yara İyileşme} = \frac{T_0 - T_t}{T_0} * 100$$



Şekil 4.10. IL-4, IL-13 ve TNF-α ile Atopik Dermatit modeli oluşturulan HaCaT hücrelerinde enkapsüle (20E ve 40E) ve enkapsüle olmayan (20F ve 40F) apigenin dozlarının yara iyileşmesi üzerine olan etkisinin çizik testi ile belirlenmesi



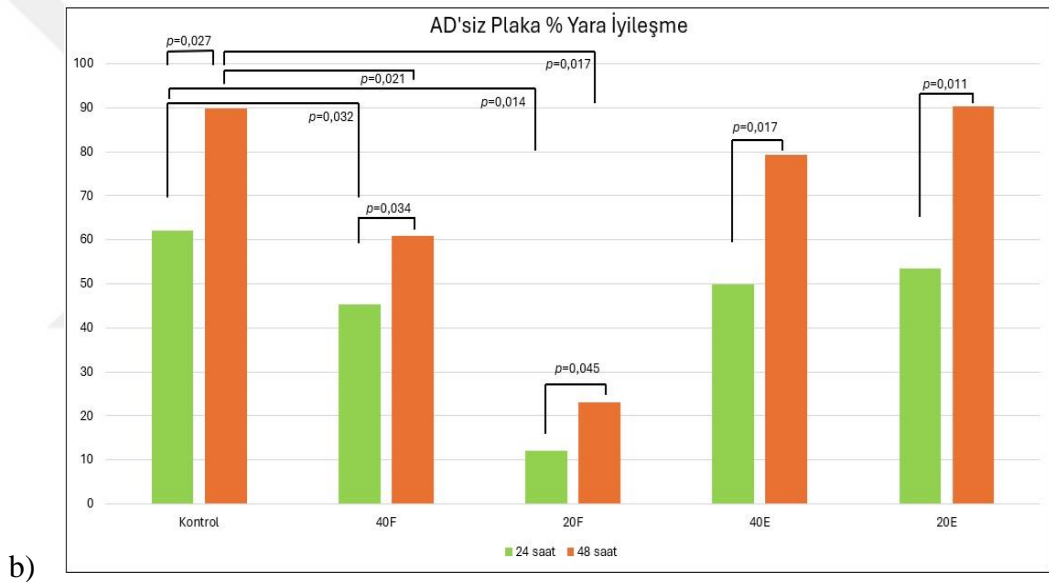
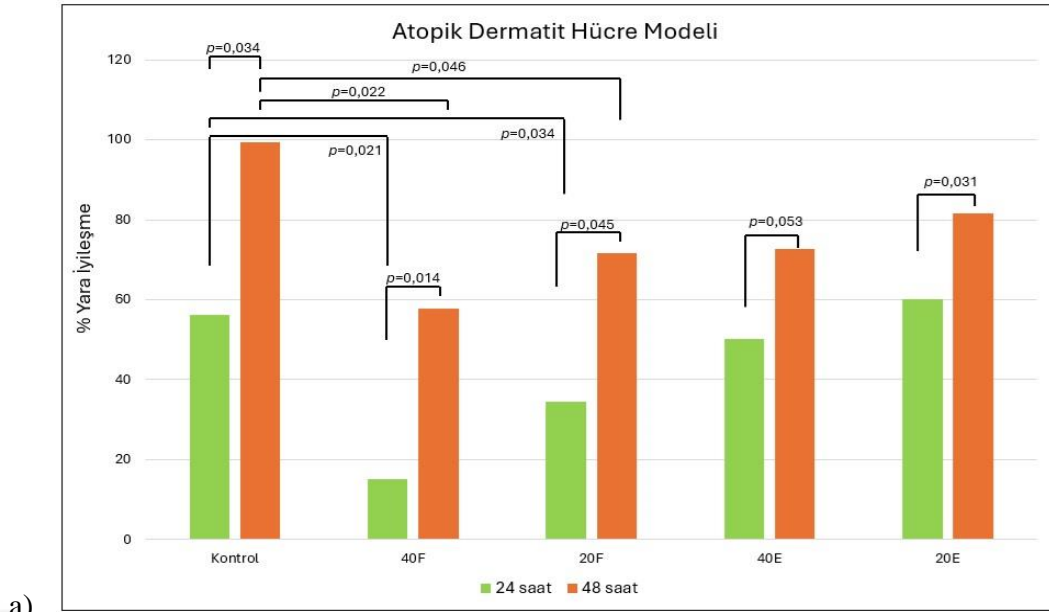
Şekil 4.11. Stimülanlar aracılığı ile stimüle edilmeyen (atopik dermatit modeli oluşturulmamış olan) HaCaT hücrelerinde enkapsüle (20E ve 40E) ve enkapsüle olmayan (20F ve 40F) apigenin dozlarının in yara iyileşmesi üzerine olan etkisinin çizik testi ile belirlenmesi

Atopik dermatit modeli oluşturulan plakada 24.saat ve 48.saatte yara iyileşme yüzdelere bakıldığında kontrol grubunun 48.saatte tamamen kapandığı gözlemlenmiştir. Enkapsüle edilmiş apigenin ile uyarılan ve enkapsüle olmayan apigenin ile uyarılan hücrelerde kullanılan her iki apigenin dozunda da kontrol grubuna kıyasla kapanma hızının daha yavaş olduğu belirlenmiştir.

Koşullar kendi aralarında kıyaslandığında; enkapsüle apigenin ile stimüle edilen hücrelerdeki kapanma yüzdesinin enkapsüle olmayan apigenin dozlarına kıyasla kontrol grubuna daha yakın olduğu ve yara iyileşmesinin daha hızlı olduğu tespit edilmiştir. 20µM enkapsüle apigenin dozu ile 40µM enkapsüle apigenin dozu kıyaslandığında ise 24. saat sonunda 20µM enkapsüle apigenin uygulanan örneklerde kapanma hızının daha fazla olduğu söylenebilir.

Benzer şekilde atopik dermatit modeli oluşturulmayan plakta kontrol grubu enkapsüle apigenin dozları ve enkapsüle olmayan apigenin ile hazırlanan dozlara kıyasla daha hızlı kapanmıştır.

Hazırlanan iki plaka için yara iyileşme yüzdeleri ve saatleri içeren grafikler aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.12).



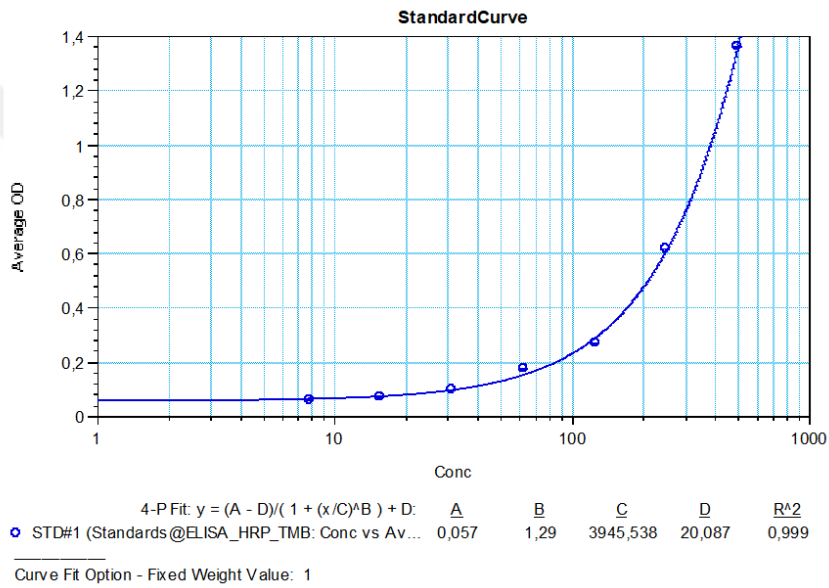
Şekil 4.12. Çizik migrasyon testi ile elde edilen 24 saat ve 48 saatte yara iyileşme yüzdelerinin gösterilmesi a) IL-4, IL-13 ve TNF- α ile Atopik Dermatit modeli oluşturulan hücreler kullanılarak b) Sitokinler ile stimüle edilmeyen (atopik dermatit modeli oluşturulmamış) hücreler kullanılarak elde edilmiş sonuçlara ait grafikler

Hücrelerin belirlenen (20 μ M ve 40 μ M) enkapsüle edilmemiş ve edilmiş olan apigenin dozları ile 24 ve 48.saatlerde gerçekleştirilen çizik mihrasyon testinin istatistiksel analizi sonucunda, AD hücre modeli oluşturulan plakalarda grupların kendisi arasında 24 saat ve 48 saat karşılaştırmalarında uygulanan her doz istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p < 0,05$). 48 saat sonunda enkapsüle edilmiş apigenin dozlarının (20E-40E) enkapsüle

edilmemiş apigenin dozlarına kıyasla (20F-40F) yaranın anlamlı derecede iyi kapandığı görülmüştür.

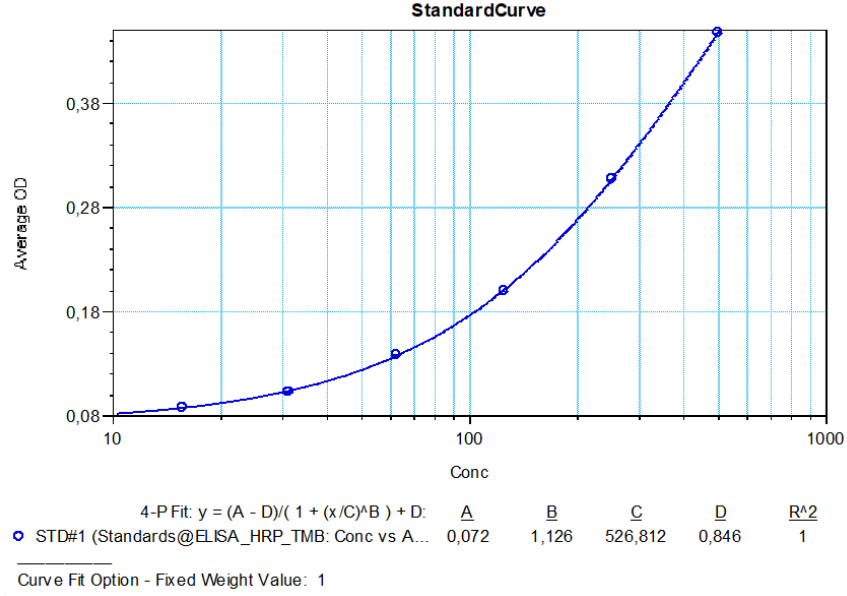
4.7. ELISA ile İnflamatuvar Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

Apigenin uygulaması sonucu insan keratinosit hücrelerinden salınan ve atopik dermatit patolojisinde etkili olan TSLP, IL-1 β , IL-22 ve IL-6 miktarındaki değişimlerin tayin edilmesinde ELISA yöntemi kullanılması amaçlanmıştır. Gerçekleştirilen ELISA deneylerinde hücre kültür süpernatantlarında IL-22 protein seviyeleri ölçülebilir düzeyde tespit edilememiştir. IL-22 ELISA ölçümüne ait standart grafik Şekil 4.13'te verilmiştir.



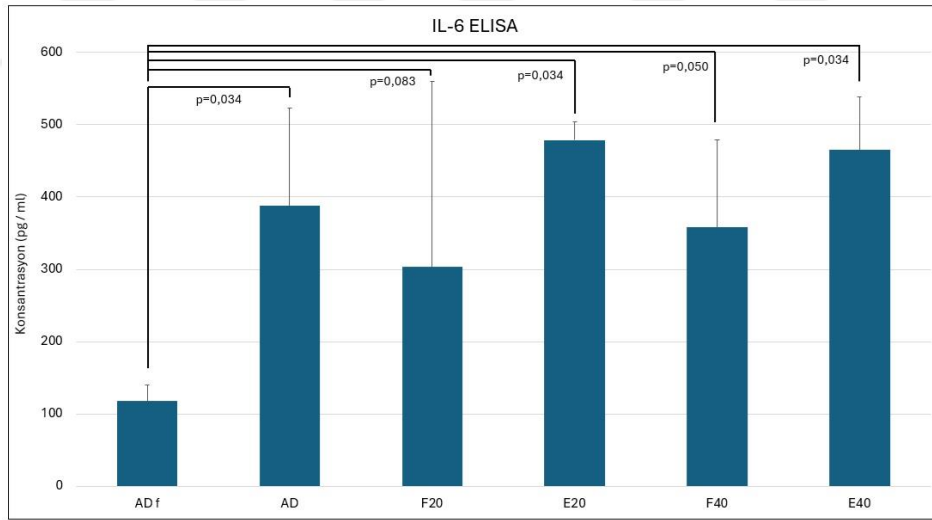
Şekil 4.13. IL-22 ELISA standart grafiği

TSLP ELISA analizi sonucunda da 6 uyarım grubuna ait toplam 30 örnekten sadece 12 sayıda örnekte ölçülebilir düzeyde TSLP proteini tespit edilmiştir. Elde edilen veriler istatistiksel analiz yapmaya elverişli olmamıştır. TSLP ELISA ölçümüne ait standart grafik Şekil 4.14' te verilmiştir.



Şekil 4.14. TSLP ELISA standart grafiği

ELISA deneylerinde ölçülebilir sonuçlar yalnızca IL-6 ELISA deneyinde elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara ait grafik Şekil 4.15'te yer almaktadır.



Şekil 4.15. Hücre kültür süpernatantlarında IL-6 protein miktarındaki değişimlerin ELISA deneyi ile tayini

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda ikili karşılaştırmaların gerçekleştirildiği Mann-Whitney U testi sonucunda AD modeli uygulanmayan hücrelerle kıyaslandığında beklenildiği üzere AD modeli uygulanan koşullarda enkapsüle edilmemiş 20µM (F20) apigenin ile uyarılmış koşul dışında her uyarımda IL-6 protein seviyeleri istatistiksel

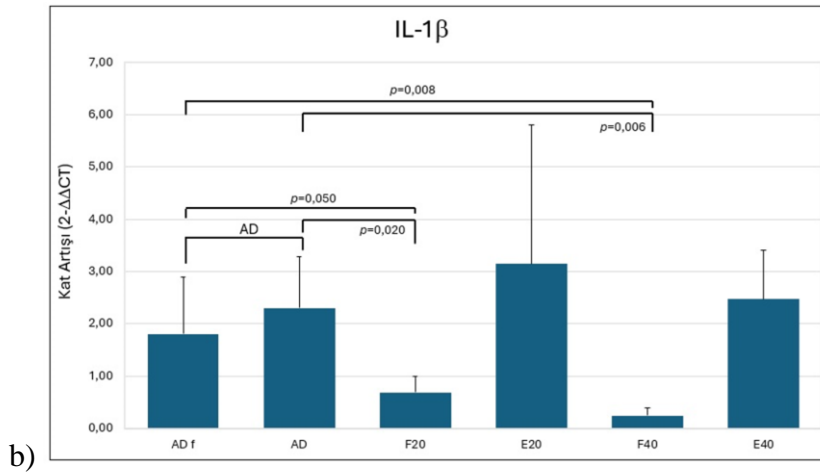
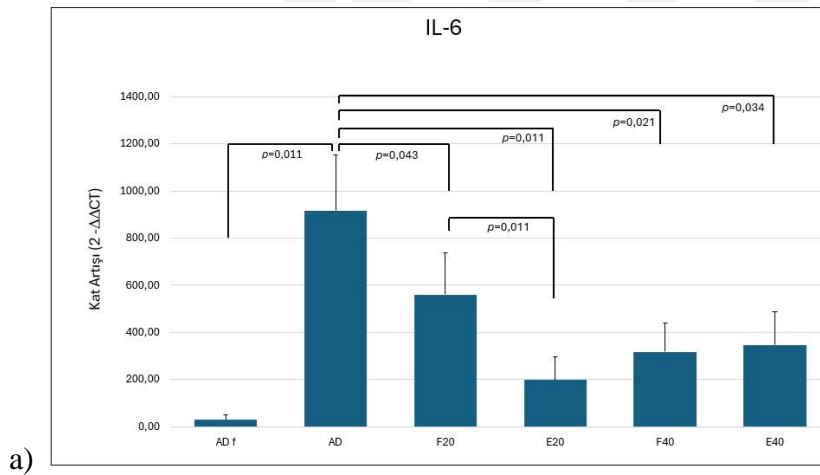
olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,050$). AD modeli uygulanmış olan ancak apigenin ile uyarılmamış hücrelerden elde edilen IL-6 protein seviyeleri ile enkapsüle edilmiş veya edilmemiş apigenin uygulanmış olan AD modeli uygulanmış olan hücrelerden elde edilen IL-6 protein seviyeleri arasında ise istatistiksel anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

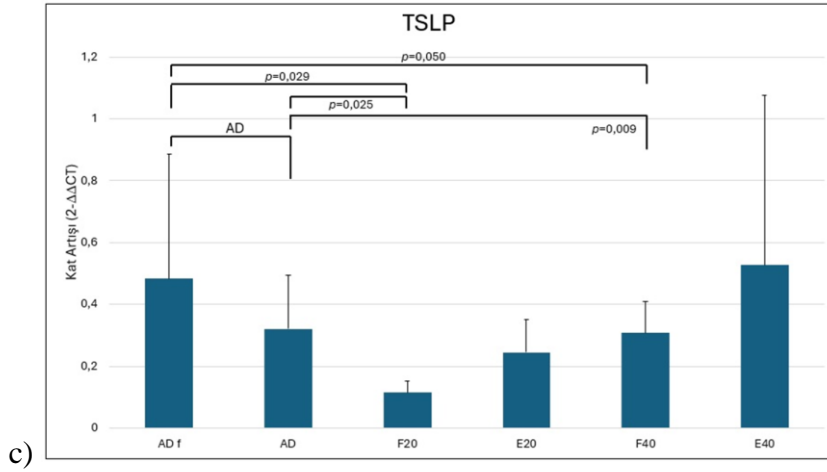
Deneyler sonucunda elde edilen süpernatantların yeterli olmaması nedeni ile planlanan IL-1 β ELISA ölçümü gerçekleştirilememiştir.

ELISA deneylerinden yeterli veri elde edilememesi nedeni ile IL-6, IL-1 β ve TSLP genlerine ait ifade düzeylerindeki değişimin Gerçek Zamanlı PZR ile değerlendirilmesine karar verilmiştir.

4.8. Gerçek Zamanlı PZR ile Sitokin Seviyelerinin Belirlenmesi

Gen ifadelerindeki değişim $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanılarak hesaplanmış ve değer kat artışı şeklinde hesaplanarak verilmiştir.





Şekil 4.16. Apigenin ile uyarım sonrasında Atopik dermatit patolojisinde önemli olan a) IL-6, b) IL-1 β , c) TSLP genlerin ifadesindeki değişimin gösterilmesi (AD f; stimulanlar aracılığı ile stimüle edilmemiş hücre, AD; stimulanlar ile stimüle edilmiş hücre, F20; stok apigenin 20 μ M dozu, E20; enkapsüle apigenin 20 μ M dozu, F40; stok apigenin 40 μ M dozu, E40; enkapsüle apigenin 40 μ M dozu)

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda tüm örnekler birbiri ile kıyaslandığında IL-6 ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı (p değeri $<0,01$) fark bulunmuştur. İkili kıyaslamalarda ise AD modeli uygulanmamış hücrelerden elde edilen ifade düzeyleri ile diğer tüm gruplar arasında ($p<0,050$) istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir. AD olmayan grup ile AD grubu kıyaslandığında yaklaşık 800 kat artış olduğu gösterilmiştir. AD grubu ile enkapsüle edilmiş ve edilmemiş apigenin ile uyarılan dozlar kıyaslandığında da IL-6 ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,050$) fark bulunmuştur. Apigenin uygulamasının AD modeli ile artmış olan IL-6 ifade seviyelerini anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca 20 μ M enkapsüle apigenin uygulamasının aynı doz enkapsüle olmayan apigenin uygulamasına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p= 0,011$) derecede IL-6 ifadelerini daha fazla azalttığı belirlenmiştir.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda tüm örnekler birbiri ile kıyaslandığında IL-1 β ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı (p değeri $<0,05$) fark bulunmuştur. AD olmayan grup ile AD grubu kıyaslandığında yaklaşık 1,5 kat artış olduğu gösterilmiştir. Enkapsüle edilmiş apigenin ile uyarılan dozlar ile ve edilmemiş apigenin ile uyarılan dozlar kıyaslandığında da IL-1 β ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,050$) fark bulunmuştur. AD grubu ile uygulanan diğer dozlar kıyaslandığında da F20 ve F40 gruplarındaki gen ifadelerindeki değişim istatistiksel

olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Enkapsüle edilmemiş apigeninin AD modeli sonrası artmış IL-1 β ifade düzeylerini enkapsüle apigenin dozlarına kıyasla belirgin şekilde azalttığı görülmüştür.

Yapılan istatistiksel analizler sonucunda tüm örnekler birbiri ile kıyaslandığında TSLP ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0,05$). Hem AD modeli uygulanmamış hücrelerden elde edilen ifade düzeyleri ile hem de AD grubu ile tüm gruplar kıyaslandığında F20 VE F40 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Serbest apigenin ve enkapsüle apigeninin aynı dozları birbirleri ile kıyaslandığında E20-F20 ve E40-F40 dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Enkapsüle edilmemiş olan apigenin dozlarının enkapsüle apigenin dozlarına kıyasla TSLP ifadesini anlamlı şekilde baskıladığı gösterilmiştir.

5. YORUM

- Atopik dermatit, günümüzde ciddi bir sağlık sorunu teşkil etmektedir. Dünya genelinde beş yaşından önceki erken çocukluk döneminde belirtilerine rastlansa da çocukluk çağında ve yetişkinlik döneminde de sıklıkla rastlanan bir cilt rahatsızlığı haline gelmiştir. Uzun süreli kaşıntı, kızarıklık, rahatsızlık verici berrak sıvılı lezyonlar gibi semptomları ile atopik dermatit hastalığından etkilenen bireylerde hem psikolojik ve fizyolojik hem de maddi sıkıntılara yol açmaktadır. Aynı zamanda, doktorlar tarafından öneriler sonucunda kullanılan topikal ilaçlar da geçici süre ile semptomların hafiflemesini ve iyileşmesini sağlasa da hastalar üzerinde semptomların tamamen yok olmasını sağlamamaktadır. Kullanılan ilaçlar ile iyileşmenin tam olarak sağlanamamasının yanında steroidil ilaçların uzun süreli kullanımının birçok yan etkisi bulunmaktadır. Bu yan etkilere ciltte meydana gelebilen atrofiler, renk ve doku kaybı örnek verilebilir. Doktor tavsiyesi dozunun dışında ve uzun süreli kullanım cilt kanserine de yol açabilir. Bu nedenle, semptomların hafifletilmesi ve iyileşmenin sağlanması amacı ile bitki kaynaklı alternatif tedavilerin bulunması ihtiyaç haline gelmiştir.

Bitki kaynaklı tedaviler sayesinde yan etkiler en aza indirgenebilir ve uzun süreli kullanım daha elverişli bir hal alabilir. İkincil bitki metabolitlerinin bir sınıfı flavonoidler, günümüzde bitki kaynaklı potansiyel tedavi yöntemlerinin önem kazanması ile birlikte sıklıkla araştırılan bir konu haline gelmiştir. Fitobiyotik olarak adlandırılan flavonoidlerin uygulama alanlarına özellikle alerjik insanların tercihi olan organik boyalar, kırıksıklık önleyici cilt bakım ürünleri ve günümüzde kullanıcıların da sıklıkla tercihi haline gelen bitki kaynaklı kozmetikler örnek verilebilir [40]. Flavonoidlerin terapötik ajan olarak insan sağlığında fayda sağladığı birçok alan bulunmaktadır. Bitkilerin kök, yaprak, gövde ve tohumlarında sıklıkla rastlanan yaklaşık olarak 10.000'den fazla flavonoid izole edilmiştir [42]. Flavonoidler, altı alt sınıfa ayrılır. Bu sınıflar arasında, yaygın olanlar asıl olarak flavonlar ve flavonoller alt sınıflarıdır.

Apigenin, flavonlar sınıfında yer alan, öne çıkan flavonoidlerdendir. Apigenin flavonoidinin öne çıkmasının sebeplerinden bazıları düşük toksisiteye ve faydalı birçok biyoaktiviteye sahip oluşudur [43]. Apigenine, meyve, sebze ve çay gibi kurutulmuş formlarda oldukça sık rastlanır. Apigenin flavonoidi ile yapılan

çalışmalar sonucunda, JAK/STAT, MAPK/ERK, PI3K/Akt/mTOR, NF-κB ve Wnt/β-katenin sinyal yollarını modüle ederek anti-inflamatuar ve antioksidan özellik gösterdiği tespit edilmiştir [44]. Apigenin flavonoidin atopik dermatit hastalığında oluşan kaşıntı, lezyonlu deri gibi semptomları inflamatuvar yolların baskılanması yolu ile iyileştirebileceği düşünülmektedir.

- Apigenin ile yapılan çalışmalara bakıldığında topikal uygulamaların deri inflamasyonundaki etkileri atopik dermatit cilt ortamı oluşturulan fare modellerinde değerlendirilmiştir. Topikal uygulamalar sonucunda, fare modelinde cilt tahribatında uygulama öncesine kıyasla anlamlı bir düzelmeye görülmüştür. Apigeninin topikal uygulamalarında yapılan araştırmalarda akut deri iltihabının topikal apigenin uygulaması ile iyileştiği ve su kaybının önlendiği sonucuna varılmıştır [45]. Apigeninin atopik dermatit rahatsızlığındaki tedavi yaklaşımlarından biri de apigenin içeren besinlerin zengin olarak bulunduğu beslenme düzeni oluşturulan farelerde lezyonlarda belirgin şekilde azalma görülmüştür [37]. Literatürde yer alan çalışmalar ışığında, Flavonlar alt sınıfına dahil olan apigenin flavonoidinin atopik dermatit hastalığında berrak akıntılı lezyonlarda azalma, iltihapta meydana gelen iyileşme ve su kaybında belirgin bir azalma olduğu ortaya konmuştur.
- Yapılan bu tez çalışmasında, apigenin flavonoidinin anti-inflamatuar etkilerini değerlendirmek için yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak 3 boyutlu hücre kültürü modeli olan yeniden yapılandırılmış insan epidermis modeli kullanılmıştır. İnsan derisi hava ile temas eden epidermal bariyer şeklinde taklit edilmesi amacı ile yeniden yapılandırılmış insan epidermis modeli kullanılmasına karar verilmiştir. Oluşturulan model sayesinde hücre kültürü ortamında hücreler IL-4, IL-13 ve TNF-α ile uyarılarak atopik cilt yapısı taklit edilmiştir. Bu sitokinlerin seçilme sebebi her üç sitokin de AD patogenezinde kritik roller almalarıdır. IL-13 geninin, atopik dermatit cilt rahatsızlığında önemli semptomlardan olan lezyonlu deride ekspresyonu belirgin şekilde yüksek çıkmaktadır. Kaşıntının iletilmesinden sorumlu sinirlerin aktive edilmesinden de IL-13 sorumludur [46]. Yapılan çalışmalarda, alınan örneklerde sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında hem lezyonlu hem de lezyonsuz deride IL-13'ün aşırı ekspresyonu meydana gelmiştir [47]. IL-4 geninin atopik dermatit hastalığında etkisi incelendiğinde, IL-4'ün aşırı ekspresyonu IgE üretiminin

artışına sebebiyet verir ve hastalık sonucunda deride meydana gelen iltihabın artışına yol açar. TNF- α da diğer iki sitokin gibi cilt bariyerinde oluşacak deformasyonlara, epidermal bütünlükte bozulmaya ve deride inflamasyonun artmasına neden olabilir [48].

- Literatürde yer alan çalışmalarda, ağırlıklı olarak fare derisi üzerinde çalışmaları yapılmıştır. Ancak insan derisi ve fare derisi büyük farklılıklar barındırmaktadır. Aynı zamanda gelecekte muhtemel olarak kullanılacak ilaçlara yönelik yapılan araştırmalarda, denemelerin kısıtlı olması nedeni ile hücre çalışmalarında elde edilen başarı gelecekte hücre modeli çalışmalarının öne çıkacağı sonucuna varmamızı sağlamıştır [49].
- HaCaT hücrelerinin farklılaşması için belirlenen genlerden lorikrin proteini (LOR), epidermin terminal olarak farklılaştırılmasında ve cilt bariyerinin meydana gelişini kolaylaştırır [50]. Filagrin bir epidermal bariyer proteindir. Filagrin proteini, deride suyun tutulabilmesi, pH düzenlenmesi ve deriye direnç kazandırması ile cilt bariyerinde oldukça önemlidir. Filaggrin geninde meydana gelecek mutasyonlar, sağlıklı cilt bariyerinin penetrasyonuna ve alerjen duyarlılığına yol açar [51,52] Yapılan tez kapsamında, tercih edilen bu üç gen aracılığı ile keratinosit farklılaşması gösterilmiştir. Bu sonuçlar 3 boyutlu hücre kültürü modeli olan yeniden yapılandırılmış insan epidermis modelinin başarı ile gerçekleştirildiği doğrulanmıştır. Bu model tek tabakalı sıvı hücre kültür modellerinin kullanıldığı atopik dermatitle ilişkili çalışmalarla kıyaslandığında uygulanan modelin gerçek cilt yapısına benzerliği nedeni ile çalışmamızdan elde edilen verileri diğer çalışmalara kıyasla gerçek yaşam verilerine daha yakın veriler olması nedeni ile daha önemli hale getirmektedir.
- Apigenin peynir altı suyu proteini izolatu ile nanoenkapsülasyon için pH döngüsü yönteminden yararlanılmıştır. Tez kapsamında yapılan pH döngüsü yöntemi, şu prensibi temel almaktadır. Fenolik hidroksil gruplarının deprotonlanmasını sağlamak ve bunun sonucunda polifenolün çözünmesi, ardından peynir altı suyunun içerdiği kazeinatla moleküler olarak bağlanmasını sağlama amacıyla nötr pH'a sahip çözeltinin pH'ını 13.0'e çıkararak, ardından pH'ı kademeli olarak 7.0'a düşürme prensibine dayanır. Bu sayede polifenoller protonlanarak moleküler olarak bağlandığı kazeinatla çöker. Bunun sonucunda, 20-30 nm çapında partiküller olarak birleşir [53,54]. Deney sonucunda elde ettiğimiz yüksek

kapsülleme verimliliği ise, pH döngüsü yönteminin apigenin ile peynir altı suyu proteini arasında güçlü bir etkileşim sağladığını ve kayıpların çok az olduğunu kanıtlar niteliktedir. Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü deneyleri, sonucunda ortalama partikül boyutu referans alınan makaleye uygun bir şekilde 500 nm civarında bulunmuştur. Negatif zeta potansiyel, partiküllerin birbirini elektrostatik olarak iterek stabil kaldığını gösterir. Zeta potansiyel ise literatürde yapılan çalışmalarla kıyaslandığında, beklendiği gibi eksi değerdedir. Negatif zeta potansiyel, partiküllerin birbirini elektrostatik olarak itmesi sayesinde stabil kaldığını gösterir. Ölçüm sonucunda elde ettiğimiz negatif değer, nanopartikül örneklerinin yüksek stabiliteye sahip olduğunu göstermektedir. Kapsülleme verimliliği ve zeta potansiyel sonuçları pH döngüsü yöntemi kullanılarak enkapsülasyonun verimli bir şekilde gerçekleştiği sonucuna varmamızı sağlamıştır.

- Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, süt proteini kullanarak apigenin nanoenkapsülasyon oluşturmak ve enkapsüle apigeninin antikanser ve anti-inflamatuar etkilerini incelenmiştir. Yapılan çalışmada, nanokapsülleme sonucunda insan kolorektal kanser hücrelerinde apigeninin hücre alımı arttığı ve yapılan fare deneylerinde oral biyoyararlanımın arttığı tespit edilmiştir. Nanoenkapsüle apigenin ile kurkumin flavonoidinin birlikte kapsülmesi ile, nitrik oksit üretimini engelleme ve proinflamatuar sitokinler olan TNF- α ve IL-6'da azalma görülmüştü [55]. Yapılan başka bir çalışmada ise, polikistik over sendromu (PCOS) olarak adlandırılan ve kadınlarda yaygın olarak görülen bu hastalıkta kapsüllemiş apigenin ve Askorbik asit'in hastalık üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Testosteronla tedavi edilen CHO (Çin Hamster yumurtalık hücreleri) hücreleriyle yapılan in vitro testler, kapsüllerinin hücre içi apoptozu etkili bir şekilde azalttığını ve koruma sağladığını ortaya koymuştur [56].
- Deneylerimizde, Atopik dermatit kaşıntı sonucu oluşan yara modelinde, enkapsüle apigenin formlarının enkapsüle olmayana kıyasla yara iyileşmesinde olan etkinliği, hem de IL-6 ve TSLP gen ifadeleri üzerine serbest apigenine kıyasla daha etkili olması enkapsüle apigeninin AD hastalığında serbest forma göre daha etkin olduğunu görmemizi sağlamıştır.
- SEM görüntülerinin incelenmesi sonucunda elde edilen nanopartiküllerin morfolojik yapılarının düzgün kenarlı ve küresele yakın olduğu tespit edilmiştir.

Nanopartiküllerin küresel yapıya yakın olması olumlu bir sonuçtur. Ancak SEM’de kümelenme gözlenmesi, agregasyon olabileceğini düşündürmektedir. Bunun nedeninin, pH döngüsü deneyinin ardından oluşan yoğun peletin besiyeri içerisinde yeteri kadar çözülmeden görüntülerin çekilmesi kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Apigenin flavonoidi suda çözünmez. Dolayısıyla öncelikle DMSO ile iyice çözünmesi sağlandıktan sonra besiyerinde seyreltilerek SEM’de görüntü alınabilmesi için örnek verilmesi ile daha iyi görüntüler elde edilmesinin mümkün olacağı düşünülmüştür.

Apigenin peynir altı suyu proteini izolatu ile nanoenkapsülasyonunun sağlandığı pH döngüsü yöntemi sırasında meydana gelen her pH değişiminde alınan örneklerle gerçekleştirilen SDS-PAGE deneyinde tüm pH koşullarına ait yüklenen örnekler yaklaşık olarak 15 kDa civarında bant vermiştir. Bu durum bize protein bileşenlerinin moleküler ağırlık açısından sabit kalarak büyük oranda değişmediğini göstermektedir.

Bu veriler ışığında, Apigenin flavonoidinin proteinleri stabilize etmiş olabileceğini söyleyebiliriz, çünkü pH 13 gibi ekstrem koşullarda bile bant aralığında bir değişim gözlemlenmemiştir. Protein bantları dağılmamış ve belirgindir, bu durum bize proteinlerin büyük oranda sabit kaldığını kanıtlar niteliktedir. Ayrıca bütün pH döngülerinin yaklaşık aynı bantlarda sonuç vermesi bize apigeninin pH döngüsü süresince peynir altı suyu proteinlerin çözünürlüğünü korumaya yardımcı olduğunu düşündürmüştür, proteinlerde bir çökme olsa farklı moleküler ağırlıkta bant vermesi gerekirdi.

- Hücre canlılığının tespit edilebilmesi adına, MTT ve LDH sitotoksite testi yapılmıştır. MTT deney sonuçları incelendiğinde, enkapsüle olmayan serbest apigenin, düşük dozlarda (10-30 μM) hücre canlılığını artırabilirken, yüksek dozlarda (40-50 μM) sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir.
- Enkapsüle apigeninde düşük dozlarda (10 μM -20 μM), saf apigenine kıyasla biraz daha fazla toksisite görülmüştür.
- Serbest apigenin dozlarının MTT ve LDH testi sonuçlarına bakıldığında, 50 $\mu\text{g/ml}$ serbest apigenin, LDH salımını en çok artıran doz (%12,2) ve aynı zamanda hücre canlılığını en çok düşüren doz (%50) bu verilere bakıldığında MTT ve LDH testi

sonuçları olması gerektiği gibi zıt gözükmektedir. 40 µg/ml'de sitotoksosite düşük oranda ortaya çıkmış ancak hücre canlılığı hala %75 civarında tespit edilmiştir. 30 µg/ml ve altındaki dozlarda sitotoksitenin azaldığı ve hücre canlılığının korunduğu gözlemlenmiştir. 10 µg/ml serbest apigenin, %98 canlılık ile kontrolle neredeyse aynı hücre canlılığına sahip. Enkapsüle apigenin dozlarına baktığımızda ise, serbest apigenine kıyasla belirgin şekilde daha düşük sitotoksosite gösterdiği görülmektedir. 50µM ve 40µM enkapsüle apigenin dozlarında LDH salımı çok düşük (%2,8 ve %2,3), buna karşılık hücre canlılığı yüksek değerler vermektedir (%92 ve %95). 30µM 'de düşük bir toksisite artışı olmasına rağmen hâlâ serbest forma kıyasla güvenli gözükmektedir.10µM olan en düşük dozda hem LDH düşük hem de hücre canlılığı en yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ışığında, enkapsüle apigenin dozlarının hücreye toksik etki göstermediğini, biyoyumluluk açısından uygun bir yapıda olduğunu söyleyebiliriz.

- Atopik dermatit hastalığının belirgin bir semptomu olan kaşıntı sonucu oluşan yaralar üzerine apigeninin etkisini incelemek amacı ile gerçekleştirilen çizik testinin sonuçları incelendiğinde, Atopik dermatit modeli oluşturulan plakada 24.saat ve 48.saatte yara iyileşme yüzdelere bakıldığında kontrol grubunun 48.saatte tamamen kapandığı gözlemlenmiştir. Apigenin uygulanan koşullar kendi aralarında kıyaslandığında; enkapsüle apigenin ile stimüle edilen hücrelerdeki kapanma yüzdesinin enkapsüle olmayan apigenin dozlarına kıyasla kontrol grubuna daha yakın olduğu ve yara iyileşmesinin daha hızlı olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, apigeninin enkapsülasyon işlemi yapılmış dozlarının daha etkili olduğu ve enkapsülasyon işlemi sayesinde yara iyileşmesinin hızlandığı sonucuna varmamızı sağlamıştır.
- Yapılan gerçek zamanlı PZR ve ELISA deneyleri sonucunda apigenin uygulamasının IL-6 gen ekspresyonu ve salımı üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Atopik dermatit modeli uygulanmayan örneklerle kıyasla atopik dermatit modeli uygulanan örneklerde IL-6 seviyelerinin hem mRNA seviyesinde hem de protein seviyesinde artmış olması atopik dermatit modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir. IL-6 inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde rol oynayan önemli bir sitokindir. AD hastalığında, IL-6 ifadesinde artış görülür bu durum alerjik enflamasyonda artışa sebep olur ve deri iltihabının

tetiklenmesinde rol oynar. Literatürde yapılan araştırmalarda, AD hastalarından alınan kan örneklerinde IL-6 düzeylerinin ELISA ile ölçümü sonucunda, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde artmış IL-6 düzeyi tespit edilmiştir [57]. Şiddetli AD hastalarında da kontrol grubu ile kıyaslandığında farkın daha açık olduğu ($p<0,001$) görülmüştür. Tez kapsamında gerçek zamanlı PZR deneyleri sonucunda ise apigenin uygulamasının AD modeli sayesinde artmış olan IL-6 gen ifadelerini anlamlı bir şekilde azalttığı gösterilmiştir. Serbest apigenin veya enkapsüle apigenin uygulaması IL-6 gen ekspresyonunu anlamlı şekilde değiştirmiştir. Ayrıca 20µM enkapsüle apigeninin enkapsüle olmayana kıyasla anlamlı bir şekilde daha fazla IL-6 gen ifadesinde azalışa neden olması enkapsülasyonun apigeninin anti-enflamatuvar etkisini arttırdığını göstermektedir. Bu durum, apigeninin IL-6 seviyelerini etkileyerek enflamasyonu modüle ettiğini göstermektedir. ELISA deneylerinden elde edilen IL-6 protein seviyeleri kıyaslandığında ise apigenin uygulamasının IL-6 protein seviyesinde anlamlı bir azalış meydana getirmediği gözlemlenmiştir. Gen ifadesi düzeyinde gözlenen bu azalmanın protein seviyesinde gözlenememiş olması deney düzeneği gereği RNA eldesi ve süpernatantların aynı zaman periyodunda elde edilmiş olmasından kaynaklanıyor olabilir. mRNA düzeyinde görülen değişim translasyonel düzeydeki (protein sentezi) değişimden daha önce gerçekleşmiş olabilir. Protein düzeyindeki değişimin görülebilmesi için daha uzun bir inkübasyon süresine ihtiyaç olabilmektedir.

- Özet olarak bu çalışma sonucunda enkapsüle apigeninin enkapsüle edilmemiş olan apigenine kıyasla daha etkin olduğu ve tez kapsamında uygulanan yüksek doz (40µM) apigenine kıyasla düşük doz (20µM) enkapsüle apigeninin hem yara iyileşmesinde hem de IL-6 ve TSLP gen ifadeleri üzerine olan etkileri nedeni ile anti-enflamatuvar olarak daha etkili olduğu gösterilmiştir. Serbest apigenin veya enkapsüle apigenin uygulaması IL-6 gen ekspresyonunu anlamlı şekilde değiştirmiş olması, apigeninin anti-enflamatuvar bir etki gösterdiğini ve atopik dermatit gibi enflamatuvar hastalıklar için potansiyel bir tedavi aracı olabileceğini düşündürmüştür.

5. KAYNAKLAR

- [1] E. Proksch, J.M. Brandner, J.M. Jensen, The skin: An indispensable barrier, *Exp Dermatol* 17 (2008) 1063–1072. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00786.x>.
- [2] R.A. Dorschner, B. Lopez-Garcia, J. Massie, C. Kim, R.L. Gallo, Innate immune defense of the nail unit by antimicrobial peptides, *J Am Acad Dermatol* 50 (2004) 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.09.010>.
- [3] M. Piipponen, D. Li, N.X. Landén, The immune functions of keratinocytes in skin wound healing, *Int J Mol Sci* 21 (2020) 1-26. <https://doi.org/10.3390/ijms21228790>.
- [4] T. Czarnowicki, H. He, J.G. Krueger, E. Guttman-Yassky, Atopic dermatitis endotypes and implications for targeted therapeutics, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 143 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.10.032>.
- [5] H. Jang, A. Matsuda, K. Jung, K. Karasawa, K. Matsuda, K. Oida, S. Ishizaka, G. Ahn, Y. Amagai, C. Moon, S.H. Kim, P.D. Arkwright, K. Takamori, H. Matsuda, A. Tanaka, Skin pH Is the master switch of kallikrein 5-mediated skin barrier destruction in a murine atopic dermatitis model, *Journal of Investigative Dermatology* 136 (2016) 127–135. <https://doi.org/10.1038/JID.2015.363>.
- [6] G. Denecker, E. Hoste, B. Gilbert, T. Hochepped, P. Ovaere, S. Lippens, C. Van den Broecke, P. Van Damme, K. D’Herde, J.P. Hachem, G. Borgonie, R.B. Presland, L. Schoonjans, C. Libert, J. Vandekerckhove, K. Gevaert, P. Vandenabeele, W. Declercq, Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss, *Nat Cell Biol* 9 (2007) 67.
- [7] A. Sandilands, C. Sutherland, A.D. Irvine, W.H.I. McLean, Filaggrin in the frontline: Role in skin barrier function and disease, *J Cell Sci* 122 (2009) 1285–1294. <https://doi.org/10.1242/jcs.033969>.
- [8] C. Esche, A. De Benedetto, L.A. Beck, Keratinocytes in Atopic Dermatitis: Inflammatory Signals, *Curr Allergy Asthma Rep* 4 (2004) 276–284.
- [9] J.H. Lee, S.W. Son, S.H. Cho, A comprehensive review of the treatment of atopic eczema, *Allergy Asthma Immunol Res* 8 (2016) 181–190. <https://doi.org/10.4168/aaair.2016.8.3.181>.
- [10] Y. Tokura, S. Hayano, Subtypes of atopic dermatitis: From phenotype to endotype, *Allergology International* 71 (2022) 14–24. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2021.07.003>.
- [11] S.M. Langan, A.D. Irvine, S. Weidinger, Atopic dermatitis, 2020. <http://www.homeforeczema.org/>.

- [12] D.A. Hill, J.M. Spergel, The atopic march: Critical evidence and clinical relevance, *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 120 (2018) 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2017.10.037>.
- [13] T. Tsakok, T. Marrs, M. Mohsin, S. Baron, G. Du Toit, S. Till, C. Flohr, Does atopic dermatitis cause food allergy? A systematic review, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 137 (2016) 1071–1078. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.10.049>.
- [14] J.T. Huang, M. Abrams, B. Tloutan, A. Rademaker, A.S. Paller, Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis decreases disease severity, *Pediatrics* 123 (2009). <https://doi.org/10.1542/peds.2008-2217>.
- [15] R. Sidbury, W.L. Tom, J.N. Bergman, K.D. Cooper, R.A. Silverman, T.G. Berger, S.L. Chamlin, D.E. Cohen, K.M. Cordoro, D.M. Davis, S.R. Feldman, J.M. Hanifin, A. Krol, D.J. Margolis, A.S. Paller, K. Schwarzenberger, E.L. Simpson, H.C. Williams, C.A. Elmets, J. Block, C.G. Harrod, W. Smith Begolka, L.F. Eichenfield, Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 4. Prevention of disease flares and use of adjunctive therapies and approaches Work Group, *J Am Acad Dermatol* 71 (2014) 1218–1233. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.08.038>.
- [16] L.F. Eichenfield, W.L. Tom, T.G. Berger, A. Krol, A.S. Paller, K. Schwarzenberger, J.N. Bergman, S.L. Chamlin, D.E. Cohen, K.D. Cooper, K.M. Cordoro, D.M. Davis, S.R. Feldman, J.M. Hanifin, D.J. Margolis, R.A. Silverman, E.L. Simpson, H.C. Williams, C.A. Elmets, J. Block, C.G. Harrod, W.S. Begolka, R. Sidbury, Guidelines of care for the management of atopic dermatitis: Section 2. Management and treatment of atopic dermatitis with topical therapies, *J Am Acad Dermatol* 71 (2014) 116–132. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.03.023>.
- [17] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S.C. Sun, NF- κ B signaling in inflammation, *Signal Transduct Target Ther* 2 (2017). <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>.
- [18] J.H. Han, J.H. Ju, Y.S. Lee, J.H. Park, I.J. Yeo, M.H. Park, Y.S. Roh, S.B. Han, J.T. Hong, Astaxanthin alleviated ethanol-induced liver injury by inhibition of oxidative stress and inflammatory responses via blocking of STAT3 activity, *Sci Rep* 8 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32497-w>.
- [19] R. Morris, N.J. Kershaw, J.J. Babon, The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway, *Protein Science* 27 (2018) 1984–2009. <https://doi.org/10.1002/pro.3519>.
- [20] Q. Zhang, I. Nowak, E.C. Vonderheid, A.H. Rook, M.E. Kadin, P.C. Nowell, L.M. Shaw, M.A. Wasik, Activation of Jak/STAT proteins involved in signal

transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome, 1996.

[21] Y. Teng, Y. Fan, J. Ma, W. Lu, N. Liu, Y. Chen, W. Pan, X. Tao, The pi3k/akt pathway: Emerging roles in skin homeostasis and a group of non-malignant skin disorders, *Cells* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/cells10051219>.

[22] Q. Zhang, P. Putheti, Q. Zhou, Q. Liu, W. Gao, Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors, *Cytokine Growth Factor Rev* 19 (2008) 347–356. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.08.003>.

[23] I.H. Huang, W.H. Chung, P.C. Wu, C.B. Chen, JAK–STAT signaling pathway in the pathogenesis of atopic dermatitis: An updated review, *Front Immunol* 13 (2022). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1068260>.

[24] S. Weidinger, L.A. Beck, T. Bieber, K. Kabashima, A.D. Irvine, Atopic dermatitis, *Nat Rev Dis Primers* 4 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0001-z>.

[25] N. Shen, T. Wang, Q. Gan, S. Liu, L. Wang, B. Jin, Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity, *Food Chem* 383 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132531>.

[26] M.M. Jucá, F.M.S. Cysne Filho, J.C. de Almeida, D. da S. Mesquita, J.R. de M. Barriga, K.C.F. Dias, T.M. Barbosa, L.C. Vasconcelos, L.K.A.M. Leal, J.E. Ribeiro, S.M.M. Vasconcelos, Flavonoids: biological activities and therapeutic potential, *Nat Prod Res* 34 (2020) 692–705. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1493588>.

[27] C.G. Fraga, K.D. Croft, D.O. Kennedy, F.A. Tomás-Barberán, The effects of polyphenols and other bioactives on human health, *Food Funct* 10 (2019) 514–528. <https://doi.org/10.1039/c8fo01997e>.

[28] B. Salehi, A. Venditti, M. Sharifi-Rad, D. Kręgiel, J. Sharifi-Rad, A. Durazzo, M. Lucarini, A. Santini, E.B. Souto, E. Novellino, H. Antolak, E. Azzini, W.N. Setzer, N. Martins, The therapeutic potential of Apigenin, *Int J Mol Sci* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20061305>.

[29] A.P. Rauter, M. Ennis, K.H. Hellwich, B.J. Herold, D. Horton, G.P. Moss, I. Schomburg, Nomenclature of flavonoids (IUPAC Recommendations 2017), in: *Pure and Applied Chemistry*, De Gruyter, 2018: pp. 1429–1486. <https://doi.org/10.1515/pac-2013-0919>.

[30] H. Slika, H. Mansour, N. Wehbe, S.A. Nasser, R. Iratni, G. Nasrallah, A. Shaito, T. Ghaddar, F. Kobeissy, A.H. Eid, Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-

mediated mechanisms, *Biomedicine and Pharmacotherapy* 146 (2022).
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112442>.

[31] K.Y. Park, G.O. Jung, K.T. Lee, J. Choi, M.Y. Choi, G.T. Kim, H.J. Jung, H.J. Park, Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*, *J Ethnopharmacol* 90 (2004) 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.043>.

[32] Y. Jiang, Y. Li, Z. Chai, X. Leng, Study of the physical properties of whey protein isolate and gelatin composite films, *J Agric Food Chem* 58 (2010) 5100–5108. <https://doi.org/10.1021/jf9040904>.

[33] S. Mitra, L.N. Nguyen, M. Akter, G. Park, E.H. Choi, N.K. Kaushik, Impact of ROS generated by chemical, physical, and plasma techniques on cancer attenuation, *Cancers (Basel)* 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/cancers11071030>.

[34] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280443> (Erişim tarihi: 20 Kasım 2024)

[35] B. Sung, H.Y. Chung, N.D. Kim, Role of Apigenin in Cancer Prevention via the Induction of Apoptosis and Autophagy, *J Cancer Prev* 21 (2016) 216–226. <https://doi.org/10.15430/jcp.2016.21.4.216>.

[36] G.L. Hostetler, R.A. Ralston, S.J. Schwartz, Flavones: Food sources, bioavailability, metabolism, and bioactivity, *Advances in Nutrition* 8 (2017) 423–435. <https://doi.org/10.3945/an.116.012948>.

[37] S. Yano, D. Umeda, S. Yamashita, K. Yamada, H. Tachibana, Dietary apigenin attenuates the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice, *Journal of Nutritional Biochemistry* 20 (2009) 876–881. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2008.08.002>.

[38] M. Hou, R. Sun, M. Hupe, P.L. Kim, K. Park, D. Crumrine, T.K. Lin, J.L. Santiago, T.M. Mauro, P.M. Elias, M.Q. Man, Topical apigenin improves epidermal permeability barrier homeostasis in normal murine skin by divergent mechanisms, *Exp Dermatol* 22 (2013) 210–215. <https://doi.org/10.1111/exd.12102>.

[39] R. Ginwala, R. Bhavsar, D.G.I. Chigbu, P. Jain, Z.K. Khan, Potential role of flavonoids in treating chronic inflammatory diseases with a special focus on the anti-inflammatory activity of apigenin, *Antioxidants* 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/antiox8020035>.

- [40] M. Danihelová, J. Viskupičová, E. Šturdík, Lipophilization of flavonoids for their food, therapeutic and cosmetic applications, *Acta Chimica Slovaca* 5 (2012) 59–69. <https://doi.org/10.2478/v10188-012-0010-6>.
- [41] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C20300> (Erişim tarihi:22 Aralık 2024)
- [42] A. Kozłowska, D. Szostak-Węgierek, D. Szostak-Węgierek, Z.Ż. Człowieka, *Rocz Panstw Zakł Hig* 2014;65(2):79-85 FLAVONOIDS-FOOD SOURCES AND HEALTH BENEFITS, 2014. <https://www.researchgate.net/publication/266254930>.
- [43] M. Wang, J. Firman, L.S. Liu, K. Yam, A review on flavonoid apigenin: Dietary intake, ADME, antimicrobial effects, and interactions with human gut microbiota, *Biomed Res Int* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/7010467>.
- [44] V. Naponelli, M.T. Rocchetti, D. Mangieri, Apigenin: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential against Cancer Spreading, *Int J Mol Sci* 25 (2024). <https://doi.org/10.3390/ijms25105569>.
- [45] M.Q. Man, M. Hupe, R. Sun, G. Man, T.M. Mauro, P.M. Elias, Topical apigenin alleviates cutaneous inflammation in murine models, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012 (2012). <https://doi.org/10.1155/2012/912028>.
- [46] M. Napolitano, F. di Vico, A. Ruggiero, G. Fabbrocini, C. Patrino, The hidden sentinel of the skin: An overview on the role of interleukin-13 in atopic dermatitis, *Front Med (Lausanne)* 10 (2023). <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1165098>.
- [47] T. Bieber, Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis, *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* 75 (2020) 54–62. <https://doi.org/10.1111/all.13954>.
- [48] J.M. Spergel, E. Mizoguchi, H. Oettgen, A.K. Bhan, R.S. Geha, Roles of T H 1 and T H 2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis, 1999.
- [49] M.O. Danso, V. Van Drongelen, A. Mulder, J. Van Esch, H. Scott, J. Van Smeden, A. El Ghalbzouri, J.A. Bouwstra, TNF- α and Th2 cytokines induce atopic dermatitis-like features on epidermal differentiation proteins and stratum corneum lipids in human skin equivalents, *Journal of Investigative Dermatology* 134 (2014) 1941–1950. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.83>.
- [50] J.A. Segre, Epidermal barrier formation and recovery in skin disorders, *Journal of Clinical Investigation* 116 (2006) 1150–1158. <https://doi.org/10.1172/JCI28521>.

- [51] D.Y.M. Leung, Our evolving understanding of the functional role of filaggrin in atopic dermatitis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 124 (2009) 494–495. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.041>.
- [52] M. Mildner, J. Jin, L. Eckhart, S. Kezic, F. Gruber, C. Barresi, C. Stremnitzer, M. Buchberger, V. Mlitz, C. Ballaun, B. Sterniczky, D. Födinger, E. Tschachler, Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases UV sensitivity in a human skin model, *Journal of Investigative Dermatology* 130 (2010) 2286–2294. <https://doi.org/10.1038/jid.2010.115>.
- [53] S. Hong, V.P. Dia, S.J. Baek, Q. Zhong, Nanoencapsulation of apigenin with whey protein isolate: Physicochemical properties, in vitro activity against colorectal cancer cells, and bioavailability, *LWT* 154 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112751>.
- [54] K. Pan, Y. Luo, Y. Gan, S.J. Baek, Q. Zhong, PH-driven encapsulation of curcumin in self-assembled casein nanoparticles for enhanced dispersibility and bioactivity, *Soft Matter* 10 (2014) 6820–6830. <https://doi.org/10.1039/c4sm00239c>.
- [55] S. Hong, Anti-cancer and anti-inflammatory activities of apigenin nanoencapsulated in dairy proteins, n.d. https://trace.tennessee.edu/utk_graddiss.
- [56] S. Nehru, A. Guru, R. Pachaiappan, A.A. Hatamleh, M.A. Al-Dosary, S. Arokiyaraj, A. Sundaramurthy, J. Arockiaraj, Co-encapsulation and release of apigenin and ascorbic acid in polyelectrolyte multilayer capsules for targeted polycystic ovary syndrome, *Int J Pharm* 651 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.123749>.
- [57] A.A. Naji, H.M. Mousa, Evaluation of Interleukin6 (IL-6) levels in Atopic Dermatitis Patients in Thi-Qar province, *University of Thi-Qar Journal of Science* 9 (2022) 49–51. <https://doi.org/10.32792/utq/utjsci.v9i1.876>.